

Kodierungsvielfalt der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase

Untersuchungen zur Expressionsregulation des Enzyms in tierischen Geweben

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Astrid Borchert
aus Crivitz

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. R. Lauster
Berichter: Prof. Dipl.-Ing. Dr.U. Stahl
Berichter: Prof. Dr. sc. med. H. Kühn

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.06.2003

Berlin 2003
D 83

Kodierungsvielfalt der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase Untersuchungen zur Expressionsregulation des Enzyms in tierischen Geweben

Selenhaltige Glutathion-Peroxidasen bilden eine Familie antioxidativer Enzyme, die in der Lage sind organische und anorganische Hydroperoxide in die entsprechenden Hydroxide zu reduzieren. Unter den beschriebenen Glutathion-Peroxidasen nimmt die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx) eine besondere Rolle ein, da sie als einziger Vertreter in der Lage ist, neben freien Hydroperoxiden auch komplexe Esterlipid-Hydroperoxide zu reduzieren. Durch die Nutzung alternativer Startkodons im Exon 1 kann die phGPx als mitochondriale oder zytosolische Form exprimiert werden. Ein alternatives Exon 1 im phGPx-Gen definiert eine weitere Glutathion-Peroxidase (snGPx), die zuerst in den Kernen der späten Spermatiden identifiziert wurde.

Bei einer detaillierten Untersuchung der Gewebeverteilung der snGPx im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Isoform außer im Hoden auch in der Niere nachgewiesen werden. Hier wurde sie im Zytosol interstitieller Nierenzellen gefunden und belegt erstmals eine somatische Expression der snGPx.

Während die phGPx in vielen Geweben exprimiert wird, wurde die snGPx nur im Hoden, in der Niere und in humanen embryonalen Nierenzellen detektiert. Um mögliche Erklärungen für diese gewebespezifische Expressionsregulation zu finden, wurden im Rahmen dieser Arbeit die potentiellen Promotorregionen für die phGPx und snGPx untersucht. Für die Bildung der phGPx-Isoformen wurde die Hauptpromotoraktivität im Exon 1a nachgewiesen. Dagegen zeigt der potentielle Promotor (Intron 1a) für die snGPx keine eigenständige Aktivität. Es konnte jedoch ein deutlich hemmender Einfluss auf die Aktivität des phGPx-Promotors nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf die Existenz eines gemeinsamen ph/snGPx-Promotors hin, der durch negativ regulatorische Sequenzen im Intron 1a beeinflusst werden kann.

DNase-Footprint Analyse führte zur Identifizierung von DNA/Protein-Kontaktpunkten im Intron 1a und im alternativen Exon 1 der snGPx-Isoform. Es wurde eine Bindung der trans-regulatorischen Proteine SP1, EGR1, WT1, SREBP1 und USF1 sowie von Proteinen der CREB- und GATA-Familie nachgewiesen. Des weiteren konnte die *in vivo*-Bindung von EGR1 und SREBP1 durch Chromatin Immunopräzipitation belegt werden.

Neben dem murinen ph/snGPx-Gen wurden zwei prozessierte phGPx-Pseudogene identifiziert. Für das Pseudogen 1, welches im Vergleich zur phGPx-cDNA nur zwei stumme Punktmutationen enthält, konnte eine gewebespezifische Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis erweitert die ohnehin schon große Transkriptionsvielfalt des ph/snGPx-Gens.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung der Selenoproteine	1
1.1.1	Die Familie der Seleno-Glutathion-Peroxidasen	2
1.1.2	Transkripte des ph/snGPx-Gens	5
1.1.3	Die phGPx als Peroxid-regulierendes Enzym	7
1.1.3.1	Rolle der mitochondrialen phGPx bei der Apoptose	8
1.1.3.2	Regulatorische Funktion der zytosolischen phGPx im Eicosanoidstoffwechsel	9
1.1.4	Bedeutung der ph/snGPx in der Spermatogenese	11
1.2	Expressionsregulation in eukaryotischen Zellen	13
1.2.1	Regulation der Transkription	14
1.2.1.1	Allgemeine Transkriptionsfaktoren	15
1.2.1.2	Spezifische Transkriptionsfaktoren	15
1.2.1.3	Alternatives Spleißen von Genen	17
1.3	Pseudogene	19
1.3.1	Einteilung der eukaryotischen DNA	19
1.3.2	Formen der Pseudogene	21
1.4	Ziel der Arbeit	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Materialien	24
2.1.1	Chemikalien und Gebrauchswaren	24
2.1.2	Geräte	25
2.1.3	Puffer, Lösungen und Nährmedien	25
2.1.4	Enzyme und Kits	28
2.1.5	DNA-Banken und Plasmide	29
2.1.6	Bakterienstämme und Zellen	29
2.1.7	Antikörper	29
2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1	Rechnergestützte Sequenzanalyse	30
2.2.2	Screening von DNA-Banken	30
2.2.2.1	Screening einer Maus cDNA-Fibroblasten-Bank nach der phGPx-cDNA	30
2.2.2.2	Screening einer genomischen Maus-Bank nach dem murinen phGPx-Gen	31
2.2.3	Chromosomale Lokalisierung	32
2.2.4	Funktioneller Promotor Assay	33
2.2.4.1	Konstruktion der Reportergene	33
2.2.4.2	Transiente Transfektionsanalysen	34
2.2.5	DNase-I-Footprint Analyse	35
2.2.6	Gelshift Assay	38
2.2.7	Chromatin Immunopräzipitation	40
2.2.8	Reverse Transkription	41
2.3	Proteinchemische Methoden	42
2.3.1	Tierexperimente	42
2.3.2	Zellkultur	43
2.3.3	Zellfraktionierung	43
2.3.3.1	Präparation zytosolischer Extrakte	43
2.3.3.2	Präparation nukleärer Extrakte	43
2.3.4	SDS-Gelelektrophorese	44
2.3.5	Western Blot und Protein-Dot Blot	45
2.3.6	Zweidimensionale-Gelelektrophorese	46
2.3.7	Messung der phGPx-Aktivität	46
2.3.7.1	Herstellung von Phosphatidylcholin-Hydroperoxiden (PCOOH)	47

2.3.7.2	Photometrische Messung der phGPx-Aktivität	47
2.3.8	Aufreinigung der snGPx aus der murinen Niere	48
2.3.9	Immunohistochemie und Immunelektronen-Mikroskopie	48
2.3.10	Proteinbestimmung.....	49
3.	ERGEBNISSE	50
3.1	Isolierung des murinen ph/snGPx-Gens.....	50
3.1.1	Klonierung der murinen phGPx-cDNA.....	50
3.1.2	Klonierung des murinen ph/snGPx-Gens	52
3.1.3	Identifizierung muriner phGPx-Pseudogene	56
3.2	Chromosomale Lokalisierung der isolierten genomischen phGPx-Sequenzen	60
3.2.1	Chromosomale Lokalisierung der identifizierten Pseudogene	60
3.2.2	Chromosomale Kolokalisierung des ph/snGPx-Gens und des Pseudogens 1	61
3.3	Funktionelle Promotorstudien am ph/snGPx-Gen	63
3.3.1	Untersuchung der potentiellen Promotorregion für die Bildung	
	der phGPx-Transkripte	63
3.3.2	Untersuchung der potentiellen Promotorregion für die Bildung	
	des snGPx-Transkripts.....	66
3.4	Untersuchung von DNA/Protein-Interaktionen in der potentiellen	
	Promotorregion der snGPx.....	69
3.4.1	Lokalisierung von cis-regulatorischen Elementen mittels	
	DNase-I- <i>in vitro</i> -Footprint	69
3.4.2	Identifizierung von trans-regulatorischen Proteinen mittels Gelshift Assay	72
3.4.2.1	Die Footprintregion FP 1 im Gelshift Assay	73
3.4.2.2	Die Footprintregionen FP 2 und FP 3 im Gelshift Assay	75
3.4.2.3	Die Footprintregionen FP 4 und FP 5 im Gelshift Assay	77
3.4.2.4	Die Footprintregion FP 6 im Gelshift Assay	78
3.4.2.5	Nachweis von <i>in vivo</i> DNA/Protein-Bindungen mittels	
	Chromatin Immunopräzipitation	80
3.5	Gewebespezifische Expression und intrazelluläre Lokalisierung der snGPx	82
3.5.1	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion der phGPx und snGPx	
	verschiedener muriner Gewebe	82
3.5.2	Proteinchemische Untersuchungen der snGPx.....	84
3.5.3	Intrazelluläre Lokalisierung der snGPx in der murinen Niere.....	86
4.	DISKUSSION	89
4.1.	Struktur und Transkriptionsvielfalt des ph/snGPx-Gens	89
4.2.	Die Bindung von positiv und negativ regulatorischen Proteinen	
	im ph/snGPx-Gen.....	94
4.3.	Funktionelle cis-regulatorische Elemente im Intron 1a und im Exon 1b	
	des ph/snGPx-Gens	98
4.4.	Expression der snGPx in der murinen Niere.....	109
4.5.	Perspektivische Betrachtungen	111
5.	LITERATURVERZEICHNIS	112
	ANHANG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIFs	Apoptose induzierende Faktoren	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Apaf-1	aktivierender Faktor für die apoptotische Protease 1	GATA	GATA-bindende Proteine
APS	Ammoniumpersulfat	GATA1	GATA-bindendes Protein 1
ATF-1	aktivierender Transkriptionsfaktor-1	giGPx	gastrointestinale Glutathion-Peroxidase
bp	Basenpaar(e)	GPx	Glutathion-Peroxidase
BSA	Rinderserumalbumin	GSSG	Disulfidform des Glutathions (oxidierte Form)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	12-HETE	12-Hydroxy-eicosa-5,8,11,13-tetraensäure
CBP	CREB bindendes Protein	15-HPETE	15-Hydroperoxy-eicosa-5,8,11,13-tetraensäure
CD95 (APO-1, Fas)	„Death receptor“ Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Familie	IL	Interleukin
cDNA	zur mRNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure	kb	Kilobasenpaar(e)
CDT	C-terminale Domäne	kD	Kilodalton
cGPx	zytosolische Glutathion-Peroxidase	LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
cM	centiMorgan	LINEs	lange verstreute DNA-Elemente
cpm	counts per minute	LOX	Lipoxygenasen
CRE	cAMP responsables Element	LTRs	lange terminale Sequenzwiederholungen
CREB	cAMP responsables Element-bindendes Protein	MALDI-MS	<i>Matrix-assisted laser-desorption ionization-MS</i>
CREM	cAMP responsibler Element Modulator	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>Messenger-RNA</i>)
DAB	Diaminobenzidin	MS	Massenspektroskopie
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol	MZF1	Myeloides Zinkfingerprotein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
DNase I	Desoxyribonuklease I	NF-Y	Nukleärer Faktor Y
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphat Set	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PCOOH	Phosphatidylcholin-Hydroperoxid
EGR	<i>early growth response gene family</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
EGR1	<i>early growth response gene 1</i>	pfu	<i>plaque forming units</i>
ESE	Spleiß-Enhancer	pGPx	Plasma Glutathion-Peroxidase
ESS	Spleiß-Silencer	ph/snGPx Gen	ein gemeinsames Gen kodiert für phGPx und snGPx
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	phGPx	Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase
FP	Footprint	Pol II	RNA-Polymerase II
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>		

PSE	Pseudogen
prä-RNA	Primärtranskript eines Gens
PUFA	polyungesättigte Fettsäuren
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SBPs	SECIS bindende Proteine
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Selenocystein
SECIS	Selenocystein-Insertionssequenz
SINEs	kurze verstreute DNA-Elemente
snGPx	in den Kernen der späten Spermatiden lokalisierte Glutathion-Peroxidase (<i>sperm nucleus GPx</i>)
SP1	Stimulierendes Protein 1 (<i>stimulating protein 1</i>)
SRE	Sterol responsables Element
SREBP1	SRE-bindendes Protein 1
SV40	Simian virus 40
TAFs	TBP assoziierte Faktoren
TBP	TATA bindendes Protein
TF	Transkriptionsfaktoren
Tris	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
USF	<i>upstream stimulating factor</i>
USF1	<i>upstream stimulating factor 1</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
WT1	Wilms Tumor Suppressor 1
ZDS	Zielsequenzdublikation(en)

1. EINLEITUNG

1.1 Bedeutung der Selenoproteine

Das Spurenelement Selen wurde in zahlreichen Proteinen identifiziert. Die Einteilung der selenhaltigen Proteine erfolgt in drei Gruppen: spezifische Selenoproteine, unspezifische selenhaltige Proteine und Selen-bindende Proteine (Behne & Kyriakopoulos, 2001). Ein physiologischer Effekt des Selens wird den spezifischen Selenoproteinen zugeschrieben, die das Element in Form von kovalent gebundenen Selenocystein besitzen. Die Bedeutung des Selens für die Gesundheit wird durch zahlreiche Studien untermauert. Untersuchungen unter Selenmangelbedingungen, die Bestimmung des Selenstatus bei verschiedenen Erkrankungen oder die Verabreichung von Selenverbindungen weisen auf eine zentrale Bedeutung der Selenoproteine hin (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Zusammenhang zwischen Selenstatus und verschiedenen Erkrankungen

Einflussbereiche des Selens	Beispiele
Immunsystem	Häufiger Selenmangel beim Verlust der Immunkompetenz (Spallholz <i>et al.</i> , 1990) Immunstimulierender Effekt bei Selengabe (Kiremidjian-Schumacher <i>et al.</i> , 1994)
Virale Infektionen	Selendefizienz als Hinweis für virale Infektionen (Tayler <i>et al.</i> , 1997) Senkung des Selen-Plasmaspiegels bei HIV-Infektionen (Look <i>et al.</i> , 1997)
Reproduktion	Selen ist essentiell für die Fortpflanzung bei Säugern (Behne <i>et al.</i> , 1996; Oldereid <i>et al.</i> , 1998)
Hirnfunktion	Geringere Selenkonzentration bei Alzheimer-Erkrankungen (Hawkes & Hornbostel, 1996) Selenentzug führt zu Depressionen (Finley & Penland, 1998)
Herz- und Gefäßfunktion	Selen wirkt schützend vor Erkrankungen des Herzens und der Gefäße (Néve, 1996)
Oxidativer Stress / Entzündungen	Selen besitzt eine schützende Wirkung bei Pankreatitis (McCloy, 1998) und Asthma (Shaheen <i>et al.</i> , 2001)
Kanzerogene-Erkrankungen	Schützende Rolle des Selens beim Leberkarzinom (Yu <i>et al.</i> , 1997) und Karzinomen der Haut (Clark <i>et al.</i> , 1996)

Der Knockout des Selenocystein-tRNA Gens bei Mäusen, welches essentiell für die Biosynthese von Selenoproteinen ist, führte zum frühzeitigen embryonalen Tod (Bösl *et al.*, 1997). Diese Tatsache unterstreicht eine grundlegende Bedeutung von Selenoproteinen schon während der Embryonalentwicklung.

1.1.1 Die Familie der Seleno-Glutathion-Peroxidasen

Selenoproteine können durch ^{75}Se selektiv *in vivo* markiert werden. Auf diese Weise konnten ca. 30-50 Selenoproteine identifiziert werden, von denen bisher weniger als 20 durch Sequenzanalyse charakterisiert wurden. Für nur etwa zwölf dieser Selenoproteine konnte die enzymatische Funktion bestimmt werden (Behne & Kyriakopoulos, 2001). Sie repräsentieren u.a. verschiedene Proteinfamilien, die alle Selenocystein in ihren aktiven Zentren besitzen. Zu diesen Proteinen zählen fünf Glutathion-Peroxidasen, drei Jodthyronin-Dejodinasen, drei Thioredoxin-Reduktasen und die Selenophosphat-Synthase-2 (Gladyshev & Hatfield, 1999; Köhrle *et al.*, 2000). Viele von diesen Proteinen sind an Redoxreaktionen beteiligt, bei denen das Selenocystein die essentielle Komponente darstellt. Die Expression von Selenoproteinen wurde in zahlreichen Geweben nachgewiesen, wobei einige gewebespezifisch exprimiert werden. Die Biosynthese erfolgt in Abhängigkeit von verfügbarem Selen, jedoch konnte eine strenge Hierarchie im Falle einer Selenlimitierung festgestellt werden. Dieser Effekt ist besonders bei Glutathion-Peroxidasen untersucht worden (Burk & Hill, 1993; Flohé *et al.*, 1997).

Die Seleno-Glutathion-Peroxidasen bilden eine Familie von Enzymen, die in der Lage sind, eine Vielzahl von organischen und anorganischen Hydroperoxiden in die entsprechenden Hydroxyverbindungen zu reduzieren. Die Reaktion erfolgt unter Nutzung von Glutathion aber auch anderer reduzierender Thiole, z.B. Thioredoxin (Brigelius-Flohé, 1999).

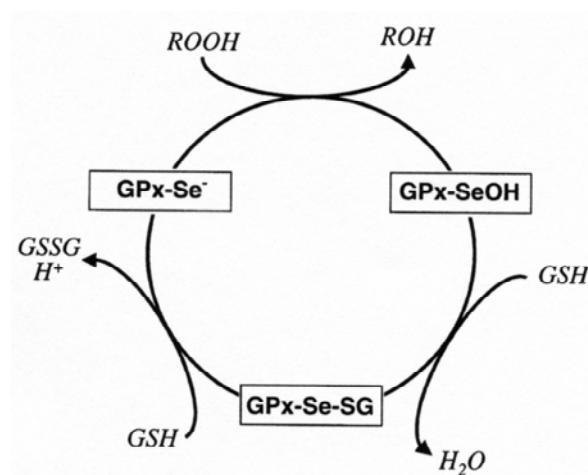


Abb. 1.2 Katalytischer Zyklus für Glutathion Peroxidasen (Flohé, 1989)

ten unter Entstehung der reduzierten Form der Glutathion-Peroxidase. Röntgenstruktur-Analysen (Ladenstein *et al.*, 1979; Epp *et al.*, 1983) belegen die Anwesenheit des Selenat-Anions in der reduzierten Form und der selenigen Säure in der oxidierten Form der Glutathion-Peroxidase.

Während der katalytischen Reaktion (Abb. 1.2) erfolgt zuerst die Oxidation des Sells durch die vorliegenden Hydroperoxide zu Derivaten der selenigen Säure (Flohé, 1997; Zachara, 1992). Dieses Zwischenprodukt wird anschließend mit Hilfe eines Elektronendonors reduziert. Dient Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel, entsteht ein Selenoldisulfid (R-Se-SG). Die Selenoldisulfidbindung wird durch ein weiteres Glutathionmolekül gespal-

Während der Katalyse ist der Oxidationszustand des Enzyms von der relativen Konzentration des reduzierenden (Glutathion) und des oxidierenden (Hydroperoxid) Substrates abhängig.

Derzeit sind fünf Glutathion-Peroxidasen näher charakterisiert (Abb. 1.3).

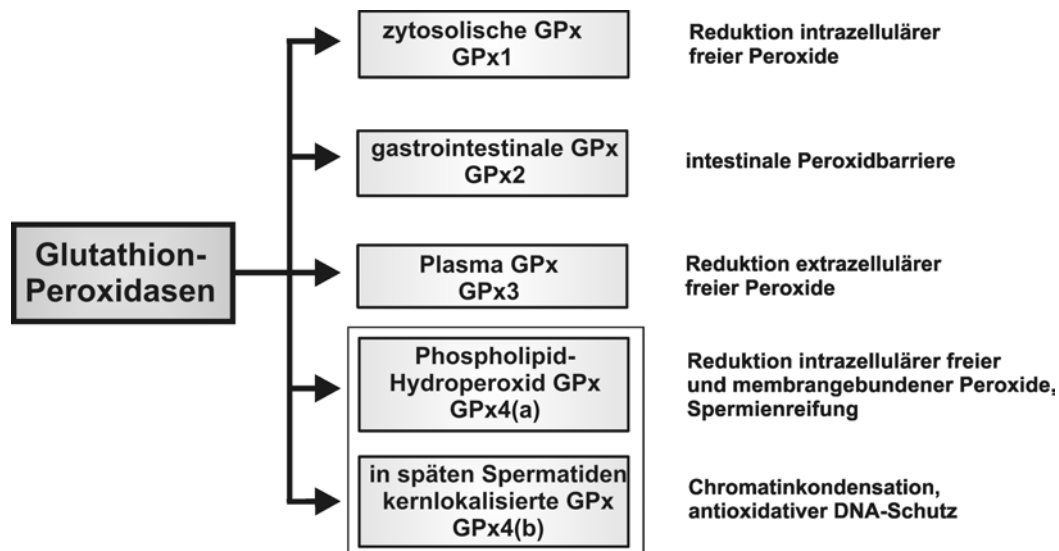


Abb. 1.3 Klassifizierung der selenhaltigen Glutathion-Peroxidasen

Die extra hervorgehobenen Glutathion-Peroxidasen (Rahmen) gehen aus einem gemeinsamen Gen hervor. Alle anderen Glutathion-Peroxidasen werden von separaten Genen kodiert. Bisher bekannte Funktionen sind aufgeführt.

Die *zytosolische Glutathion-Peroxidase (cGPx)* war das erste identifizierte Selenoprotein (Flohé *et al.*, 1973). Sie wird in fast allen Geweben exprimiert, ist jedoch ungleichmäßig verteilt. In der Leber und den Erythrozyten der Ratte liegt die cGPx-Aktivität um zwei Größenordnungen höher als im Gehirn oder im Skelettmuskel (Behne & Wolters, 1983). Das Enzym besteht aus vier identischen Selenocystein-haltigen Untereinheiten von je 22 kD und katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und verschiedenen wasserlöslichen organischen Peroxiden. Auf diese Weise trägt die cGPx zur antioxidativen Abwehr von reaktiven Peroxiden bei. Der Knockout der cGPx zeigte keinen Phänotyp (Ho *et al.*, 1997), jedoch besaßen diese Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress induzierenden Substanzen, wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Paraquat (de Haan *et al.*, 1998). Unter Selenmangel erfolgt ein starker Expressionsabfall der cGPx, jedoch wurden kaum Auswirkungen unter physiologischen Bedingungen festgestellt (Sunde *et al.*, 1997; Behne *et al.*, 2001).

Die *gastrointestinale Glutathion-Peroxidase (giGPx)* ist, ähnlich wie die cGPx, ein zytosolisches Selenoenzym, das aus vier identischen Selenocystein-haltigen Untereinheiten von je 22 kD zusammengesetzt ist und verschiedene Peroxide reduzieren kann (Chu *et al.*, 1995). In Ratten wird dieses Protein ausschließlich im gastrointestinalen Bereich exprimiert.

Beim Menschen konnte es auch in der Leber nachgewiesen werden (Chu *et al.*, 1993). Die gewebespezifische Expression der giGPx deutet auf eine wichtige Funktion in der Abwehr von Lipid-Hydroperoxiden aus der Nahrung hin (Brigelius-Flohé, 1999). Die giGPx ist äußerst resistent gegenüber Selenmangel.

Die *Plasma Glutathion-Peroxidase (pGPx)* ist ebenfalls aus vier Untereinheiten von je 23 kD zusammengesetzt. Im Gegensatz zu cGPx und giGPx ist die pGPx ein Glykoprotein und wurde im Blutplasma entdeckt (Takahashi *et al.*, 1987). Es wird hauptsächlich in der Niere exprimiert und von dort ins Blut abgegeben (Yoshimura *et al.*, 1991). In geringeren Mengen wurde die pGPx auch in der Leber, im Gehirn und in anderen Organen nachgewiesen. Die biologische Funktion ist noch unklar (Brigelius-Flohé, 1999). Die Glutathion-Bindungsdomäne ist in der pGPx schlecht konserviert, so dass auch Thioredoxin oder Glutaredoxin als Elektronendonoren fungieren können (Björnstedt *et al.*, 1994). Diese Erkenntnisse sind vereinbar mit der niedrigen Glutathionkonzentration im Blutplasma. Selenmangel bewirkt eine rasche Beeinträchtigung der pGPx-Expression (Brigelius-Flohé, 1999).

Die *Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx)* wurde 1982 als Protein entdeckt, das vor Lipidperoxidation schützt (Ursini *et al.*, 1982). Die phGPx konnte in vielen Zellen und Geweben nachgewiesen werden. Eine besonders hohe Expression des Enzyms liegt im Hoden vor (Brigelius-Flohé, 1999). Im Gegensatz zu den anderen charakterisierten Glutathion-Peroxidasen ist die phGPx ein Monomer von ca. 20 kD und kommt überwiegend im Zytosol und in den Mitochondrien vor (Roveri *et al.*, 1992). Unter Selenmangel ist die phGPx deutlich resistenter als die cGPx und die pGPx. Des weiteren ist die phGPx als einzige GPx in der Lage direkt Phospholipid- und Cholesterol-Hydroperoxide zu reduzieren, wodurch eine Funktion der phGPx im Schutz gegen oxidative Schädigungen von Membranen nahe liegt. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine regulatorische Funktion der phGPx in Redoxprozessen hin, wie z.B. bei Entzündungen oder bei der Apoptose. Eine weitere bedeutende Rolle spielt dieses Protein in der Spermatogenese (Imai & Nakagawa, 2003).

Die in den Kernen der späten Spermatiden lokalisierte Glutathion-Peroxidase (*sperm nucleus glutathione peroxidase - snGPx*) stellt die zuletzt identifizierte GPx dar (Pfeifer *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein Selenoprotein von 34 kD, deren Expression zunächst nur in den späten Spermatiden nachgewiesen wurde. Sie ist dort in den Kernen lokalisiert und an der Chromatinkondensation während der Spermatogenese und am Schutz der DNA gegen oxidative Schädigungen beteiligt (Pfeifer *et al.*, 2001). Unter Selenmangel geht die Expression der snGPx auf ca. ein Drittel zurück (Behne & Kyriakopoulos, 2001).

Die phGPx und die snGPx werden von einem gemeinsamen Gen kodiert. Aufgrund der Unterschiede in der zellulären und subzellulären Lokalisierung sowie in der biologischen Funktion sollten beide als separate Glutathion-Peroxidasen betrachtet werden (Abb. 1.3).

1.1.2 Transkripte des ph/snGPx-Gens

Auf mRNA-Ebene existieren drei bekannte Transkripte des ph/snGPx-Gens, die für Proteine mit unterschiedlichem N-Terminus kodieren. Grundsätzlich werden die mRNA-Transkripte durch 7 Exons im ph/snGPx-Gen definiert. Die Exons 2-7 kodieren den Hauptteil des Proteins und sind für alle drei Transkripte identisch. Durch die alternative Wahl von Exon 1a oder 1b wird die phGPx oder die snGPx definiert (Abb. 1.4).

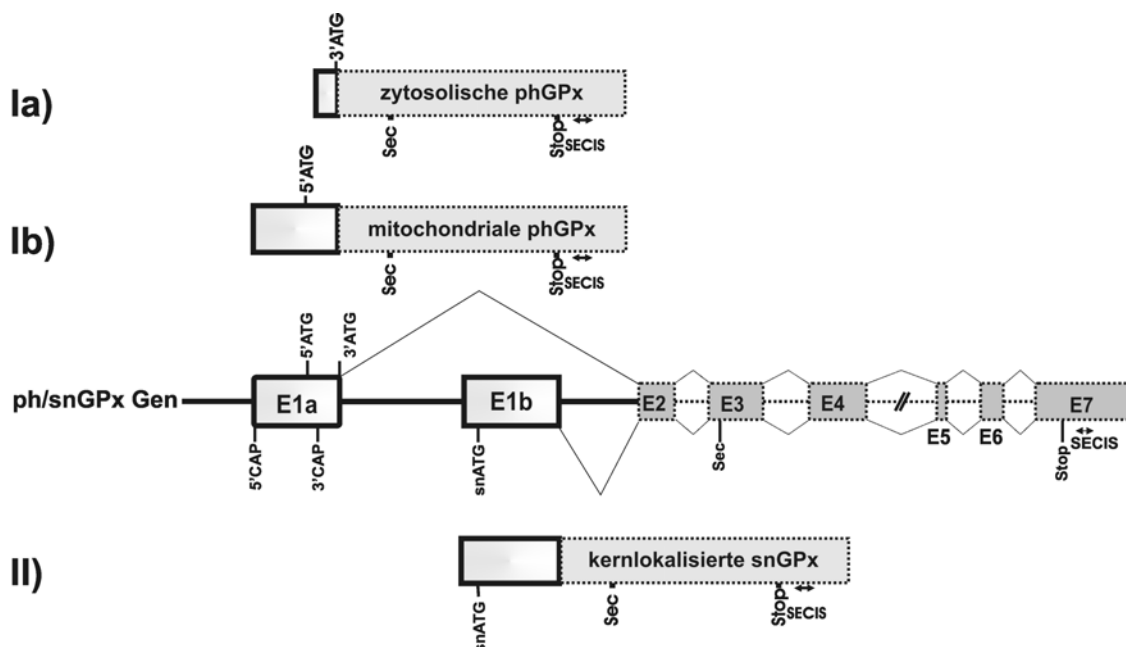


Abb. 1.4 Transkripte des ph/snGPx-Gens

Das ph/snGPx-Gen kodiert für drei N-terminal verschiedene mRNA-Transkripte. Ia) kodiert für die zytosolische Form der phGPx, Ib) kodiert zusätzlich N-terminal ein mitochondriales Insertionspeptid und II) enthält N-terminal eine nukleäre Lokalisationssignal. Die alternative Nutzung von Exon 1a und Exon 1b ermöglicht die Festlegung der unterschiedlichen N-Termini. Exon 2-7 sind in allen drei Transkripten enthalten und definieren das aktive Zentrum (Selenocystein: Sec) des Enzyms. Im Exon 7 befindet sich die Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS), die für die kotranslationale Insertion des Selenocysteins erforderlich ist.

Im Exon 1a (E1a) für die phGPx befinden sich zwei potentielle in frame Startkodons: 5'-ATG und 3'-ATG. Pushpa-Rekha *et al.* zeigten 1995 mit Hilfe von RNase-Protection Assays mit RNA verschiedener Gewebe der Ratte, dass im Hoden der Transkriptionsstart hauptsächlich vor dem 5'-ATG (Abb. 1.4, Ib) liegt. In somatischen Geweben wie z.B. Niere, Milz, Lunge, Leber und Herz wurde der Transkriptionsstart überwiegend zwischen 5'- und 3'-ATG (Abb. 1.4, Ia) identifiziert. Es existieren zwei unterschiedlich lange Transkriptfamilien für die

phGPx, mit unterschiedlichen Startkodons. Der Translationsstart vom 5'-ATG (Abb. 1.4, 1b) führt zu einem Protein von ca. 23 kD mit einem N-terminalen Signalpeptid, das den Transport der phGPx in die Mitochondrien ermöglicht (Arai *et al.*, 1999). Unmittelbar nach dem Transport in die Mitochondrien wird dieses Signalpeptid abgetrennt und die phGPx liegt dann als ca. 20 kD Protein vor (Arai *et al.*, 1996).

Der Translationsstart vom 3'-ATG führt zur zytosolischen (nicht-mitochondrialen) Form der phGPx von ca. 20 kD und besitzt kein Signalpeptid für den mitochondrialen Import (Abb. 1.4, 1a). Die Transfektion der cDNA für das kurze Transkript in RBL-2H3 Zellen (basophile Leukämie-2H3 Zellen der Ratte) zeigte die Expression der nicht-mitochondrialen Form in den Kernen, im endoplasmatischen Retikulum und im Zytosol (Arai *et al.*, 1999).

Durch die alternative Nutzung des Exon 1b (E1b) wird die snGPx definiert. Dieses Exon kodiert für eine Arginin-reiche Sequenz und enthält ein nukleäres Lokalisationssignal, welches die snGPx befähigt, in die Kerne der Spermien zu gelangen (Pfeifer *et al.*, 2001).

Auf welche Weise die verschiedenen mRNA-Transkripte gebildet werden, ist noch unklar. Sowohl alternative Initiationsstartpunkte der Transkription als auch alternative prä-mRNA Prozessierung (alternatives Spleißen) sind möglich.

Das im Exon 3 gelegene TGA-Kodon definiert das Selenocystein (Abb. 1.4). Normaler Weise kodiert dieses Triplet für einen Translationsstopp. Die Rekodierung des TGAs für Selenocystein erfordert eine spezielle mRNA-Sekundärstruktur (Haarnadelstruktur), die durch die Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) gebildet wird (Böck, 2000). In Eukaryoten wird diese Haarnadelstruktur durch SECIS-bindende Proteine (SBPs) erkannt. Die Interaktion dieser SBPs mit den an der Selenocysteyl-tRNA^{Sec} gebundenen Faktoren verhindert die Termination der Verlängerung der Peptidkette durch den eukaryotischen Releasefaktor (eRF), der das Stoppkodon erkennt, daran bindet und den Translationsstopp herbeiführen würde (Goto *et al.*, 2001). Die SECIS befindet sich im 3'-untranslatiertem Bereich der ph/snGPx-Transkripte (Abb. 1.4).

Eine weitere Besonderheit in der Biosynthese von Selenoproteinen ist, dass Selenocystein nicht als solches an tRNA gebunden wird. Eine mit Serin beladene tRNA (Seryl-tRNA^{Sec}) wird mit Selenophosphat in eine Selenocysteyl-tRNA^{Sec} umgewandelt. Selenophosphat wird wiederum mit der Selenophosphat-Synthase aus ATP und H₂Se synthetisiert (Low & Berry, 1996).

1.1.3 Die phGPx als Peroxid-regulierendes Enzym

Oxidativer Stress stellt ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Superoxidradikale O_2^- , Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder Hydroxylradikale HO^\cdot) und den zellulären antioxidativen Schutzsystemen dar. Die vermehrte Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies hat primär die Peroxidation von Membranlipiden in Zellen und Geweben zur Folge (Yu, 1994). Durch die Eigenschaft der phGPx neben freien Hydroperoxiden auch membrangebundene Hydroperoxide reduzieren zu können, nimmt sie eine besondere Rolle im Schutzsystem der Membranen gegen oxidative Schädigungen ein. Die Bedeutung der phGPx als Regulator intrazellulärer Hydroperoxide wird durch zahlreiche Experimente in verschiedenen Zellsystemen (Tab. 1.1) und den erst kürzlich erfolgten Knockout des ph/snGPx-Gens (Yant *et al.*, 2003) belegt. Zellen in denen die mitochondriale Form der phGPx überexprimiert wird, sind deutlich resistenter gegenüber oxidativem Stress, der zur Schädigung der Mitochondrienfunktion führt.

Tab. 1.1 Hemmender Einfluss der, in verschiedenen Zellen überexprimierten, phGPx-Formen auf den induzierten Zelltod (nach Imai & Nakagawa, 2003)

phGPx über-exprimierende Zelllinie	Induktion des Zelltods durch	Apoptose	Inhibitor des Zelltods	Referenz
RBL-2H3	AAPH (Radikalinitiator)	-	nicht-mitochondriale phGPx	Imai <i>et al.</i> , 1996
basophile Leukämie Zellen 2H3 (Ratte)	15-HPETE	-	nicht-mitochondriale phGPx	Arai <i>et al.</i> , 1999
	H_2O_2			
	t-BuOOH	-	mitochondriale phGPx	Arai <i>et al.</i> , 1999
	Rotenone (chem. Hypoxie)			
	KCN (chem. Hypoxie)			
	Glukoseentzug			
	2-Deoxyglukose			
	Staurosporine	x	mitochondriale phGPx	Nomura <i>et al.</i> , 1999
	Etoposide			
	Actinomycin			
	UV			
104C1 (Meerschweinchen)	Phosphatidylcholin	-	phGPx	Yagi <i>et al.</i> , 1996
	Hydroperoxid			
SMC Glattmuskelnzellen der Aorta (Kaninchen)	Linolensäure-Hydroperoxid	x	phGPx + Selenit	Brigelius-Flohé <i>et al.</i> , 2000
CORH-BR1 Brustkrebs (Mensch)	Cholesterol-Hydroperoxide	x	mitochondriale phGPx	Hurst <i>et al.</i> , 2001
BL Zellen	geringe Zelldichte	x	phGPx	Brielmeier <i>et al.</i> , 2001
Burkitt Lymphom Zellen	wenig Serum			
MCF-7 Brustkrebs (Mensch)	singulärer Sauerstoff	x	mitochondriale phGPx	Wang <i>et al.</i> , 2001

In phGPx überexprimierenden Zellen wird dem, durch äußere Stimuli, induzierten Zelltod entgegengewirkt (Tab 1.1). Aufgrund der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisierung besitzen die nicht-mitochondriale und die mitochondriale Form der phGPx unterschiedlichen Einfluss.

Auswirkungen einer Hemmung der Zellatmung durch KCN, wie Bildung von Hydroperoxiden, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Verlust der Plasmamembran-Integrität werden durch die Überexpression der mitochondrialen Form der phGPx stark unterdrückt. Die Überexpression der nicht-mitochondrialen Form der phGPx führt im Vergleich zu den nicht transfizierten Kontrollzellen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber extrazellulären Hydroperoxiden (H_2O_2 , t-BuOOH oder 15-HPETE). Die mitochondriale Form der phGPx ist aber auch unter diesen Bedingungen effektiver im Schutz der Zellen gegen oxidative Schädigungen (Nomura *et al.*, 2001). Des weiteren schützt die Überexpression der mitochondrialen Form in RBL-2H3 Zellen vor induzierter Apoptose (Nakagawa & Imai, 2000).

Der homozygote Knockout des ph/snGPx-Gens erwies sich schon während der Embryonalentwicklung als letal und belegt eine frühe grundlegende Funktion (Yant *et al.*, 2003). Heterozygote ph/snGPx Mäuse entwickeln sich normal. Zellen dieser Tiere erwiesen sich jedoch unter Bedingungen des oxidativen Stress viel anfälliger als die entsprechenden Zellen der Kontrolltiere und untermauern eine zentrale Rolle der phGPx im antioxidativen Schutzsystem.

1.1.3.1 Rolle der mitochondrialen phGPx bei der Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein genetisch regulierter Vorgang, bei dem die Aktivierung von Caspasen eine zentrale Rolle spielt. Knockout-Experimente verschiedener Caspasen (Kuida *et al.*, 1998) und des aktivierenden Faktors für die apoptotische Protease 1 (Apaf-1) (Yoshida *et al.*, 1998) belegen zwei verschiedene Wege der Apoptose: die CD95 (APO/Fas) vermittelte Apoptose und die primär von den Mitochondrien ausgehende Apoptose. Die CD95 vermittelte Apoptose ist durch die Ansammlung von Signalkomplexen am CD95-Rezeptor gekennzeichnet, was zu einer autoproteolytischen Aktivierung der Caspase 8 führt (Nagata, 1997).

Der zweite Weg führt durch die Freisetzung von apoptotischen Faktoren wie Cytochrom C und anderer Apoptose induzierender Faktoren (AIFs) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien zur Aktivierung entsprechender Caspasen und damit zur Apoptose (Reed, 1997).

Die Mitochondrien stellen die Hauptquelle für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) dar, die überwiegend während der mitochondrialen Atmung gebildet werden (Guarnieri *et al.*, 1992). Shimizu *et al.* (1996) zeigten, dass ein erhöhter Gehalt an ROS in den Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom C und damit zur Initiation der Apoptose führt. Die Überexpression der mitochondrialen Form der phGPx in RBL-2H3 Zellen führte zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose induzierender Substanzen, wie z.B. 2-Deoxyglukose oder durch Glukoseentzug. Dagegen zeigten RBL-2H3 Zellen, welche die nicht-mitochondriale Form der phGPx überexprimieren die typischen Erscheinungen der Apoptose.

Die Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom C durch die mitochondriale phGPx deutet auf eine Funktion von Lipidhydroperoxiden bei der Freisetzung des Cytochroms C hin. Cytochrom C befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien und kann sekundär an Cardiolipin, einem Phospholipid der Mitochondrien-Innenmembran, gebunden werden. Cardiolipin verliert seine Affinität zu Cytochrom C durch Peroxidation. Die reduzierte Form dagegen sichert wiederum die Affinität (Nomura *et al.*, 2000).

In verschiedenen Krebszelllinien wurde eine erhöhte Expression der phGPx nachgewiesen (Maiorino *et al.*, 1991). Möglicherweise besteht hier ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Apoptose und Expression der phGPx. Brielmeier *et al.* (2001) beschrieben die phGPx als anti-apoptotischen Faktor in Burkitt Lymphom Zellen.

Umfangreiche Untersuchungen belegen, dass die phGPx durch die Fähigkeit Phospholipid-Hydroperoxide zu reduzieren, als anti-apoptotischer Faktor fungieren kann (Imai & Nakagawa, 2003; Imai *et al.*, 2003). Heterozygote ph/snGPx Knockout-Mäuse zeigten sich deutlich sensibler gegenüber durch γ -Strahlung induzierter Apoptose und untermauern die bisherigen Ergebnisse (Yant *et al.*, 2003).

1.1.3.2 Regulatorische Funktion der zytosolischen phGPx im Eicosanoidstoffwechsel

Lipidperoxidation kann als schädigender jedoch auch als nützlicher Prozess betrachtet werden. Hydroxyperoxidgruppen beeinträchtigen hydrophobe Lipid-Lipid und Lipid-Protein Wechselwirkungen in komplexen Lipid-Protein Assoziaten (Biomembranen, Lipoproteine). Als Konsequenz kommt es zu strukturellen Veränderungen von Biomembranen und Lipoproteinen, die u.a. zu Funktionsbeeinträchtigungen führen können. Hydroperoxidgruppen, als Quelle für die Bildung freier Radikale, führen zu sekundären Schädigungen weiterer Membran- und Lipoprotein-Bestandteilen, die den zerstörenden Effekt intensivieren (Kühn &

Borchert, 2002). Unter kontrollierten Bedingungen (Zeitpunkt, Ort) kann die Lipidperoxidation jedoch als nützlicher ja sogar physiologisch essentieller Prozess angesehen werden, z.B. in der Eicosanoidsynthese (Straus & Glass, 2001; Bulger & Maier, 2000), bei der Zellreifung (Schewe *et al.*, 1986; van Leyen *et al.*, 1998) oder bei der Lipidmobilisierung während des Keimungsprozesses von Samen (Feussner *et al.*, 1995; Feussner *et al.*, 2001). Für die Regulation solcher Prozesse ist ein antioxidatives Schutzsystem notwendig.

Lipoxygenasen (LOX) stellen eine weit verbreitete Familie im Lipidperoxidstoffwechsel dar, die in der Lage sind, die Oxygenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxyverbindungen zu katalysieren. Die 12/15 LOX ist ein besonderer Vertreter unter den Lipoxygenasen, da diese Isoform in der Lage ist, auch komplexe Esterlipide zu oxygenieren (Schewe *et al.*, 1975; Murray & Brash, 1988). Die phGPx ist als Gegenspieler dieser Lipoxygenase zu sehen, da sie als einzige Seleno-Glutathion-Peroxidase die Fähigkeit besitzt, diese komplexen Esterlipid-Hydroperoxide zu reduzieren und damit ein unkontrolliertes Fortschreiten der Peroxidation in diesen komplexen Verbindungen regulieren kann.

Die regulatorische Wirkung der phGPx schließt auch die Aktivitätskontrolle verschiedener Lipoxygenasen (12/15-LOX, 12-LOX und 5-LOX) ein. Es konnte gezeigt werden, dass die Oxygenierung freier ungesättigter Fettsäuren (12-LOX, 5-LOX) und komplexer Biomembranen (12/15-LOX) durch die phGPx reguliert werden kann. Die Überexpression der nicht-mitochondrialen Form der phGPx in RBL-2H3 Zellen führte zu einer deutlich geringeren Leukotrienbildung (Imai *et al.*, 1998). Leukotriene werden aus freigesetzter Arachidonsäure gebildet, die als erstes durch die 5-LOX oxygeniert wird. Die phGPx reguliert die 5-LOX-Aktivität durch die Herabsetzung des zellulären Hydroperoxidgehaltes, der essentiell für die LOX-Aktivität ist. Leukotriene fungieren u.a. als Mediatoren bei anaphylaktischen und inflammatorischen Prozessen (Samuelsson, 1987; Lewis *et al.*, 1990). Für die 12/15-LOX konnte die Oxygenierung von Biomembranen oder humanem LDL durch die phGPx ebenfalls verhindert werden. Die Vorinkubation von Biomembranen oder humanem LDL mit der phGPx verhinderte die Oxygenierung durch die 12/15-LOX ebenfalls durch die Herabsetzung des Hydroperoxidtonus (Schnurr *et al.*, 1996; Belkner *et al.*, 1998). Durch die nachträgliche Zugabe von Hydroperoxiden wird die LOX-Aktivität wieder hergestellt.

Die phGPx fungiert des weiteren als Inhibitor der 12-LOX in humanen epidermalen Krebszellen (A431) (Huang *et al.*, 1998). Die Transfektion dieser Zellen mit einem phGPx-Antisense-Oligonukleotid führte zu einer verstärkten Bildung von 12-HETE und Prostaglandinen (Chen *et al.*, 2000). Systematische Untersuchungen mit teilweise gereinigter phGPx aus

A431 Zellen belegen deren hemmende Wirkung auf die 12-LOX (Plättchen-Typ), 15-LOX (Retikulozyten-Typ) und die Cyclooxygenase-2 (Huang *et al.*, 1999). Ein regulatorischer Effekt der phGPx auf die Prostaglandinsynthese konnte auch für die, in RBL-2H3 Zellen überexprimierte, nicht-mitochondriale Form der phGPx gezeigt werden. Prostaglandine besitzen u.a. eine bedeutende physiologische Rolle in Abwehr- und Entzündungsreaktionen (Sakamoto *et al.*, 2000).

Für die phGPx und die 12/15-LOX konnte eine Cytokin-abhängige Regulation gezeigt werden. Bei einer Behandlung humaner Lungen-Krebszellen (A549) mit IL-4 oder IL-13 wurde eine erhöhte 12/15-LOX-Expression unter gleichzeitiger Absenkung der phGPx verzeichnet (Schnurr *et al.*, 1999). Diese inverse Regulation der pro-oxidativen LOX und der antioxidativen phGPx führte zu einem Anstieg des oxidierenden Potentials in der Zelle.

1.1.4 Bedeutung der ph/snGPx in der Spermatogenese

Die Sensibilität humaner Spermatozoen gegenüber oxidativen Stress wurde schon 1973 von Jones und Mann festgestellt. Humane Spermatozoen weisen einen hohen Anteil an polyungesättigten Fettsäuren (PUFA) auf, die besonders anfällig gegenüber oxidativen Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind (Kim *et al.*, 1998). Die Peroxidation von Lipiden führt zur Beeinträchtigung der Spermienbeweglichkeit (Alvarez & Stores, 1982), verursacht Missbildungen des Spermienmittelstückes (Rao *et al.*, 1989) und übt somit einen negativen Einfluss auf die Fortpflanzung aus (Aitken *et al.*, 1989). Eine besondere Rolle für die Fortpflanzungsfähigkeit der Spermatozoen spielen Mitochondrien. Schädigungen der Mitochondrien führen zu einem Verlust der Beweglichkeit der Spermien und zur Unfruchtbarkeit (Folgero *et al.*, 1993). Des weiteren ist Selen essentiell für eine erfolgreiche Fortpflanzung. Selenmangel führt zu Veränderungen im Spermienmittelstück verbunden mit einer schlechten Beweglichkeit (Oldereid *et al.*, 1998).

Im Hoden wurden die Seleno-Glutathion-Peroxidasen cGPx und phGPx nachgewiesen. Durch die besondere Fähigkeit neben freien Hydroperoxiden auch komplexe Esterlipid-Hydroperoxide zu reduzieren, nimmt die phGPx auch hier eine besondere Stellung im antioxidativen Schutzsystem ein. Von allen getesteten Organen liegt eine besonders hohe Aktivität im Hoden vor (Brigelius-Flohé, 1999). Die Expression der phGPx im Hoden beginnt erst mit der Pubertät und zeigt im postpubertären Hoden, insbesondere in den reifenden Spermatisden, die höchste Aktivität (Roveri *et al.*, 1992).

Immunohistochemische Untersuchungen zeigen die phGPx überwiegend in den Mitochondrien der Spermatogonien (Roveri *et al.*, 1994). In den reifen Spermatozoen dagegen konnte keine phGPx-Aktivität nachgewiesen werden. Das Protein bildet dort einen Hauptbestandteil der mitochondrialen Kapsel (Ursini *et al.*, 1999). Die phGPx verändert sich während der Differenzierung der Spermatiden zu den reifen Spermatozoen vom aktiven Enzym zum enzymatisch inaktiven Strukturprotein, das für die Funktionalität von Spermatozoen unabdingbar ist.

Gegen Ende der Spermienreifung sinkt der Glutathiongehalt in den Spermien. Da die phGPx keine ausgeprägte Glutathion-Bindungsstelle besitzt (Maiorino *et al.*, 1995), kann sie auch mit Protein-SH-Gruppen reagieren und polymerisiert so mit sich selbst und anderen Proteinen zum keratinartigen Material der Kapsel. Die Bedeutung der phGPx im Hoden liegt somit nicht nur in einer Peroxid-reduzierenden Schutzfunktion.

Eine grundlegende Bedeutung der phGPx in der Spermatogenese wird durch die systematische Untersuchung unfruchtbarer Männer hinsichtlich der phGPx-Expression deutlich (Imai *et al.*, 2001). Bei ca. 10% der untersuchten Männer wurde eine um 80-90% reduzierte phGPx-Expression festgestellt. Die Beweglichkeit der reifen Spermatozoen war bei diesen Patienten deutlich geringer. Die genauere Untersuchung der Spermien zeigte starke Veränderungen in der Morphologie der Mitochondrien des Mittelstückes. Eine intakte Mitochondrienfunktion ist Voraussetzung für die Beweglichkeit der reifen Spermien und die stark reduzierte Expression der mitochondrialen phGPx kann zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrien führen (Imai & Nakagawa, 2003).

Eine weitere Veränderung bei diesen Patienten stellte die deutlich geringere Anzahl der Spermatozoen dar (Imai *et al.*, 2001). Die Spermatogenese ist ein komplexer Vorgang, der bisher noch wenig verstanden wird. Knockout-Experimente von Genen, die für die Apoptose eine wichtige Rolle spielen, weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen Apoptose und der Keimzelldifferenzierung hin (Imai & Nakagawa, 2003). Eine Verminderung der phGPx-Expression in Ratten führte zu einer beschleunigten Apoptose von Keimzellen während der Spermatogenese (Woolveridge *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Rolle der mitochondrialen phGPx als anti-apoptotischer Faktor in der Spermatogenese hin.

Die phGPx-Expression bei heterozygoten ph/snGPx Knockout-Mäusen liegt noch deutlich über 50% im Vergleich zu den Kontrolltieren und führt zu keiner Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit (Yant *et al.*, 2003).

Eine weitere Seleno-Glutathion-Peroxidase, die im Hoden eine Rolle spielt, stellt die snGPx dar (Pfeifer *et al.*, 2001). Das Protein wurde als einziges Selenoprotein in den Kernen der späten Spermatiden identifiziert und unterscheidet sich von der phGPx nur in der N-terminalen Sequenz. Diese wird durch ein alternatives Exon 1 im ph/snGPx-Gen kodiert, ist Arginin-reich und enthält ein nukleäres Insertionssignal (siehe Abschnitt 1.1.2).

Die snGPx wird im Zusammenhang mit der Reorganisation des Chromatins diskutiert (Pfeifer *et al.*, 2001). Das Stadium der späten Spermatiden ist durch Veränderungen, wie z.B. dem Austausch der Histone durch Protamine und der Reorganisation und Kondensation der DNA im Kern gekennzeichnet. Letzteres führt zu einer sehr dicht gepackten DNA, die durch eine Vernetzung von Protaminthiolen charakterisiert ist und eine erhöhte Resistenz gegenüber chemischen und mechanischen Stress mit sich bringt (Loir & Lanneau, 1978).

In vivo-Experimente belegen, dass unter Selenmangel die Expression der snGPx auf ca. ein Drittel absinkt und die Kerne der späten Spermatiden bei Ratten eine deutliche Störung der Chromatinkondensation aufweisen (Behne & Kyriakopoulos, 2001).

1.2 Expressionsregulation in eukaryotischen Zellen

Die Umsetzung der in einem Gen gespeicherten Informationen, die letztendlich zur Bildung des entsprechenden Proteins führt, bezeichnet man als Expression. Die entwicklungs-, gewebe- und mengenspezifische Expression von Genen entsprechend den Erfordernissen der Zelle kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden (Abb. 1.5).

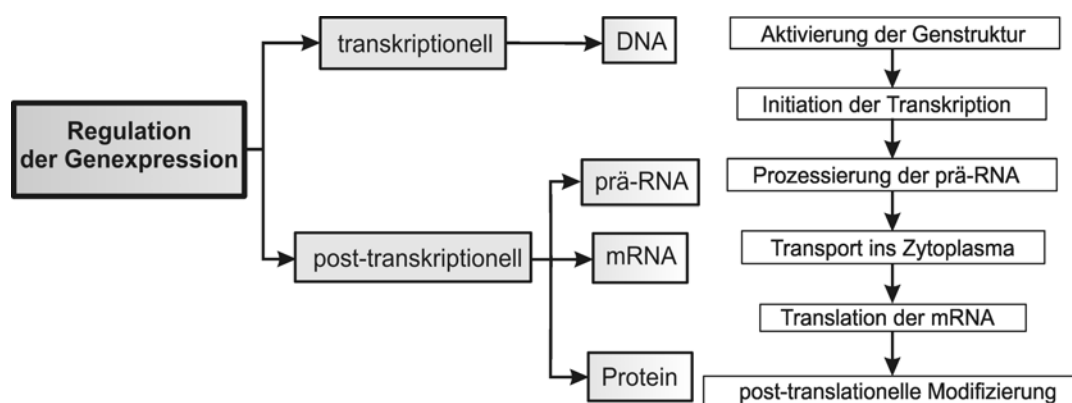


Abb. 1.5 Verschiedene Ebenen der Expressionskontrolle

Die DNA liegt in eukaryotischen Zellen mit Histonproteinen assoziiert als Nukleosom vor und bildet in seiner Gesamtheit das Chromatin. Für eine Genaktivierung muss zuerst die Struktur im Promotorbereich gelockert werden, so dass sich der Transkriptionsapparat an-

lagern kann. Die Modifizierung der Histonproteine durch Aktivatoren oder Repressoren besitzt dabei eine Schlüsselfunktion. Die Acetylierung von Histonen ermöglicht die Wechselwirkung zwischen der Promotor-DNA und allgemeinen Transkriptionsfaktoren und fördert so die Initiation der Transkription. Proteine wie CBP (CREB-bindendes Protein) oder die TFIID-Untereinheit des basalen Transkriptionsapparates besitzen Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität und wirken als Aktivatoren (Lewin, 2000).

Die aus der Transkription der Gene resultierenden Primärtranskripte werden mehreren biochemischen Veränderungen unterzogen, die man als RNA-Prozessierung zusammenfasst. Diese umfasst drei Hauptprozesse: 5'-Cap-Modifikation, 3'-Spaltung/Polyadenylierung und RNA-Spleißen, die im Zellkern erfolgen und funktionelle mRNA erzeugen. Aus didaktischen Gründen werden diese Prozesse häufig getrennt beschrieben. In der Zelle laufen diese jedoch eng miteinander verbunden ab.

Der als RNA-Spleißen bezeichnete Vorgang nimmt eine besondere Rolle ein. Hierbei werden die nichtkodierenden Sequenzen (Introns) der prä-RNA zwischen den kodierenden Bereichen (Exons) herausgeschnitten. Die Nutzung von alternativen Spleißorten führt dazu, dass von einem Gen in verschiedenen Zelltypen oder in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedliche mRNA-Transkripte gebildet werden können. Für ca. ein Drittel der proteinkodierenden Gene des Menschen wurde eine alternative Exonwahl durch alternatives Spleißen beobachtet (Goldstrohm *et al.*, 2001).

Weitere Kontrollmöglichkeiten der Genexpression bieten der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, die Beeinflussung der Translation durch Aktivierung oder Inaktivierung von mRNAs oder die post-translationelle Modifikation der Proteine (Abb. 1.5).

1.2.1 Regulation der Transkription

Bei Eukaryoten erfolgt die Regulation vieler Gene durch die Steuerung der Transkription. Für die Synthese von mRNA muss eine RNA-Polymerase die Transkription starten, Ribonukleotid-triphosphate komplementär zum kodierenden DNA-Strang polymerisieren und schließlich die Transkription beenden.

Die Kerne aller bisher untersuchten eukaryotischen Zellen enthalten drei verschiedene RNA-Polymerasen. Jede katalysiert die Transkription von Genen, die einen anderen RNA-Typ kodieren. Die RNA-Polymerase I katalysiert die Synthese der ribosomalen Vorläufer-Ribonukleinsäuren (Prä-rRNA). Für die Transkription der tRNA, 5S-RNA und einiger kleineren Ribonukleinsäuren ist die RNA-Polymerase III verantwortlich.

Alle proteinkodierenden Gene werden durch die RNA-Polymerase II (Pol II) katalysiert, die an der Bildung der mRNAs und einiger kleiner Kern RNAs (snRNAs) beteiligt ist. Sie beginnt mit der Transkription an DNA-Sequenzen, die der 5'-Cap-Region der mRNA-Moleküle entsprechen. Die Region stromaufwärts der 5'-Cap-Region wird als Promotor bezeichnet, der die regulatorischen Elemente für die Transkriptionsinitiation enthält. Derzeit sind drei verschiedene Elemente bekannt, die ein allgemeines Merkmal transkribierter Gene darstellen. Am häufigsten ist die TATA-Box. Bei anderen Genen findet man Initiatoren oder CpG-Inseln (Lodish *et al.*, 2001).

1.2.1.1 Allgemeine Transkriptionsfaktoren

Für die Aktivierung der Pol II sind allgemeine Transkriptionsfaktoren notwendig, die mit der Pol II einen Komplex bilden und an allen Promotoren für die Initiation der Transkription benötigt werden. Der Pol II-Initiationskomplex lagert sich schrittweise zusammen.

Der erste Schritt bei der Bildung des Komplexes ist die Bindung von TFIID an die TATA-Box. TFIID setzt sich aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammen. An TFIID binden die Faktoren TFIIA und TFIIB, wodurch das Binden der RNA-Polymerase II, vermittelt durch den Faktor TFIIF, ermöglicht wird. Weitere TFII-Proteine (E,H,J) vervollständigen den Komplex, wobei TFIIH besondere Funktionen zukommen. Aufgrund seiner Proteinkinase-Aktivität wird eine Untereinheit der Pol II phosphoryliert und damit für die Transkription aktiviert. Die Helikase-Aktivität zweier TFIIH Untereinheiten trennt die Matrizenstränge am Transkriptionsstartpunkt auf. Der Pol II-Transkriptionsinitiationskomplex, der sich *in vivo* an Promotorsequenzen zusammenlagert, setzt sich wahrscheinlich aus 60-70 Polypeptiden zusammen.

Bei TATA-losen Promotoren bindet TFIID mit Hilfe der TAFs an der Initiationssequenz oder Transkriptionsfaktoren wie SP1 binden an GC-reiche Sequenzen (nichtmethylierte CpG-Inseln) und vermitteln somit die Transkriptionsinitiation (Crawford *et al.*, 1999; Gunther *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Spezifische Transkriptionsfaktoren

Die Effizienz und die Spezifität mit der ein Promotor erkannt wird, hängt von kurzen cis-regulatorischen Sequenzen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes ab. Promotornahe Elemente bis ca. 500 bp stromaufwärts unterstützen durch die Bindung trans-aktiver Proteine (Transkriptionsfaktoren) die Regulation vieler eukaryotischer Gene.

Des weiteren können Sequenzelemente, die sich in großem Abstand vom Startpunkt der Transkription befinden die Genexpression beeinflussen. Solche Elemente können stromaufwärts oder stromabwärts oder auch innerhalb einer Transkriptionseinheit liegen. Man nennt diese Sequenzen Enhancer, wenn die Bindung entsprechender Transkriptionsfaktoren die Expression des Gens verstärkt. Erfolgt durch die Bindung eine Hemmung der Genexpression, werden diese Sequenzen Silencer genannt.

Man unterscheidet cis-regulatorische Sequenzen, die für den Grundprozess der Transkription eine Rolle spielen und solche die für die Regulation der Transkription bedeutend sind.

Ubiquitär vorkommende Faktoren stehen wahrscheinlich allen Promotoren zur Verfügung, die deren spezifische Bindungssequenzen enthalten. Solche stromaufwärts gelegenen Elemente sind z.B. die CCAAT-Box oder die GC-Box. Viele Promotoren brauchen eines oder mehrere dieser Elemente, um effizienter funktionieren zu können.

Andere cis-regulatorische Elemente kommen nur in speziellen Genen vor, z.B. das Sterol responsible Element (SRE) oder das cAMP responsible Element (CRE). Die bindenden Transkriptionsfaktoren können durch äußere Einflüsse, entwicklungs- und/oder gewebe-spezifisch reguliert werden. Faktoren der CREB-Familie (CREB, ATF-1 und CREM) sind in der Lage an CRE zu binden. So steuert der zelluläre cAMP-Gehalt die Bindung von CREB an CRE und induziert damit die Expression zahlreicher Gene. CREM zählt zu den gewebe-spezifischen Transkriptionsfaktoren und wird im Hoden nur in bestimmten Stadien der Spermatogenese exprimiert. Durch die Bindung von CREM an CRE kann die Regulation von testisspezifischen Genen erfolgen, die genau in diesen Stadien benötigt werden (Sassone-Corsi, 1997).

Transkriptionsfaktoren sind modulare Proteine, die aus unterschiedlichen funktionellen Domänen bestehen. Dabei handelt es sich um eine DNA-Bindungsdomäne, die mit bestimmten DNA-Sequenzen in Wechselwirkung tritt und um eine Aktivierungsdomäne, die zusammen mit anderen Proteinen die Transkription stimuliert.

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren enthalten eine Vielzahl verschiedener Struktur motive, die mit bestimmten DNA-Sequenzen in Wechselwirkung treten. Der Typ der DNA-Bindungsdomäne dient zur Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren. Die meisten Klassen zeichnen sich durch charakteristische Aminosäuresequenzen aus. Zu den wesentlichen DNA-Bindungsdomänen-Motiven zählen das Zinkfinger-Motiv, das Homöodomänen-Motiv, das Helix-Loop-Helix-Motiv und das Leucin-Zipper-Motiv.

Einige Transkriptionsfaktoren können Heterodimere ausbilden, wodurch sich die Möglichkeiten der Expressionsregulation erweitern.

1.2.1.3 Alternatives Spleißen von Genen

Die Expression von mehr als einem Drittel aller Proteine wird reguliert, indem die Prozessierung der Primärtranskripte ihrer Gene beeinflusst wird. Dabei besteht ein enger Zusammenhang von Transkription und Spleißen. Diese Prozesse werden heute nicht mehr losgelöst voneinander betrachtet, sondern als ko-transkriptionelles Spleißen der prä-mRNA definiert (Goldstrom *et al.*, 2001). Die Transkriptions- und Spleißmaschinerie stellen beide sehr große Komplexe dar, die in unmittelbarer Nähe zueinander wirken und miteinander interagieren. Die transkriptionelle Aktivierung der RNA-Polymerase II verursacht eine Assoziation von Proteinen, die für konstitutives und alternatives Spleißen erforderlich sind (Ceres & Kornblihtt, 2002). So konnte z.B. die direkte Interaktion von regulierenden Spleiß-Faktoren (SR) mit der hyperphosphorylierten C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II nachgewiesen werden (Bentley, 1999).

Das Primärtranskript der RNA-Polymerase II, die prä-mRNA, besteht aus den kodierenden Sequenzen (Exons) und den nichtkodierenden Sequenzen (Introns). Die Entfernung der Introns führt zur reifen mRNA, die für das entsprechende Protein kodiert. Der Prozess, bei dem die Introns entfernt werden, heißt Spleißen. Die Spleißmaschinerie erkennt vier spezifische Sequenzen auf beiden Seiten des Intron-Exon-Überganges: die 5'-Spleißseite (Donor), die Verzweigungsstelle, die pyrimidin-reiche Region und die 3'-Spleißseite (Akzeptor). Auch exonische Sequenzen wie Spleiß-Enhancer (ESE) oder -Silencer (ESS) können maßgeblichen Einfluss auf das Spleißmuster ausüben (Abb. 1.6).

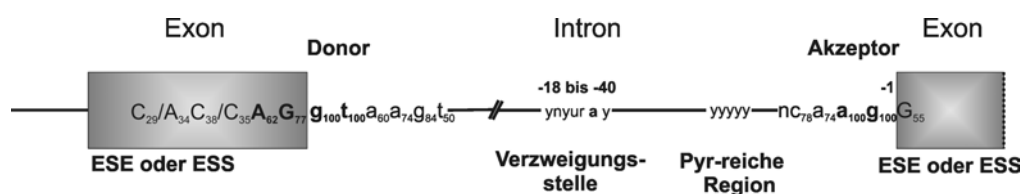


Abb. 1.6 Sequenzmotive, die auf das Spleißen der prä-mRNA Einfluss nehmen (nach Nissim-Rafinia & Kerem, 2002)

Die einzigen fast immer vorkommende Nukleotide in den intronischen Sequenzen sind die Paare gt (Donor) und ag (Akzeptor). Der Grad der Konservierung ist durch die tiefgedruckte Zahl gekennzeichnet. Nahe am Akzeptor gelegen, befindet sich eine pyrimidinreiche Region und die Verzweigungsstelle mit der ebenfalls konservierten Base **a**. Alle vier Bereiche sind essentiell für die korrekte Spleißstellenerkennung.

In den angrenzenden Exons können ebenfalls für die Identifizierung der Spleißorte wichtige regulatorische Elemente (ESE-exonischer Spleiß-Enhancer, ESS-exonischer Spleiß-Silencer) existieren.

γ- Pyrimidin (Pyr), n- beliebiges Nukleotid, r- Purin

Durch schrittweise Anlagerung kleiner Ribonukleoproteine (snRNPs: U1, U2, U4-U6) und 50-100 weiteren Spleißfaktoren an die prä-mRNA bildet sich ein großer Komplex, der Spleißosom genannt wird (Burge *et al.*, 1999). Das Spleißosom katalysiert zwei Umesterungs-

reaktionen, welche die Exons verknüpfen und das Intron in Form einer Lassostruktur entfernen (Singh, 2002).

Die Vielzahl der bekannten Proteine kann nicht auf eine entsprechende Anzahl von Genen zurückgeführt werden. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung post-transkriptioneller Mechanismen in der Expressionsregulation. Alternatives Spleißen einer prä-RNA führt zu mRNAs, die für verschiedene Protein-Isoformen kodieren (Abb. 1.7).

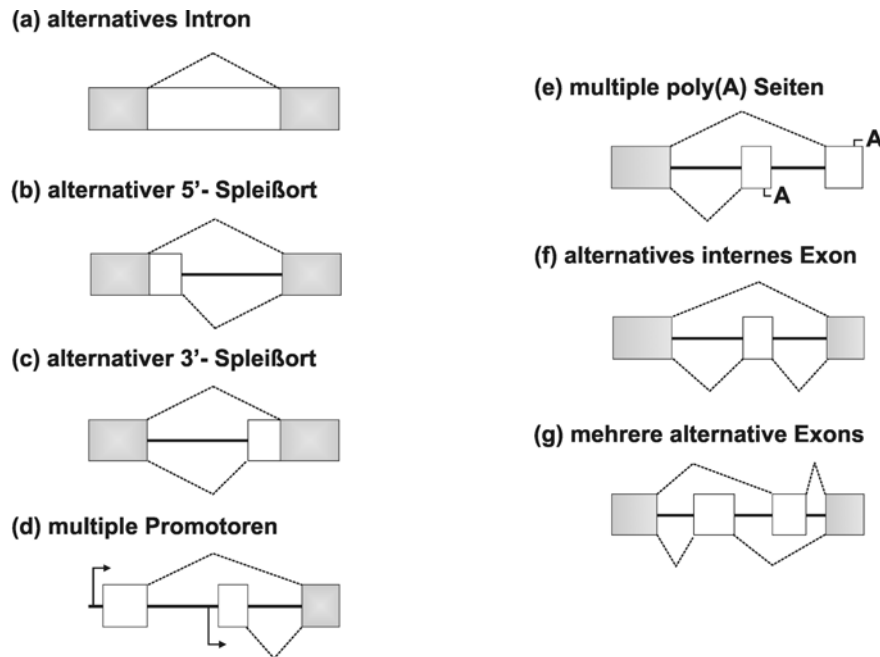


Abb. 1.7 Typen des alternativen Spleißens (nach Roberts & Smith, 2002)

Die Abbildung zeigt die Vielfalt des alternativen Spleißens. Die Boxen stellen die Exons dar, wobei die weißen Boxen die alternativen Varianten kennzeichnen. Das Spleißmuster wird durch die gestrichelten Linien hervorgehoben.

Das Intron kann entweder herausgeschnitten werden oder in der mRNA erhalten bleiben (a). Individuelle Exons können alternative 5'-Spleißorte (b) oder 3'-Spleißorte (c) aufweisen. Alternatives Spleißen kann in Verbindung mit alternativen Promotoren (d) (Pfeile) oder verschiedenen Polyadenylierungsseiten (e) zu verschiedenen 5'- bzw. 3'-Enden eines Transkripts führen. Ein Exon kann alternativ enthalten sein oder herausgespleißt werden (f). Weiterhin ist das unterschiedliche Spleißen mehrerer alternativer Exons (g) möglich.

Für die Erkennung alternativer Spleißorte ist die Aktivierung schwacher Spleißseiten und die Unterdrückung starker Spleißseiten erforderlich. Regulatorische Sequenzen in der prä-mRNA definieren durch die Bindung trans-regulatorischer Faktoren die Wahl der Spleißseiten und damit die resultierende mRNA-Isoform (Singh, 2002). Vielfältige Faktoren, sowohl zell- und entwicklungsspezifische als auch ubiquitäre, können durch ihrer Interaktionen die Wahl der Spleißorte vermitteln (Smith & Valcárcel, 2000).

Die Interaktionen der vielen Proteine des Spleißapparates, die zur spezifischen Prozessierung der prä-mRNA führen sind fest reguliert und bis zu 15% der genetischen Erkrankungen beim Menschen sind auf Mutationen von regulatorischen Sequenzen zurückzuführen, die das

Spleißen der prä-mRNA beeinflussen (Ceres & Kornblihtt, 2002; Nissim-Rafinia & Kerem, 2002).

1.3 Pseudogene

1.3.1 Einteilung der eukaryotischen DNA

Im Gegensatz zu den Prokaryoten und niederen Eukaryoten enthalten die Genome der Wirbeltiere zahlreiche Sequenzen, die keine RNAs kodieren und nach unserem derzeitigen Wissen auch keine strukturellen und regulatorischen Funktionen besitzen (Tab. 1.2).

Tab. 1.2 Organisation eukaryotischer DNA (nach Lodish *et al.*, 2001)

DNA-Sequenz	Beispiele
proteinkodierende Gene	Einzelgene dublizierte Gene - Genfamilien divergierte Gene - Pseudogene
tandemartig wiederholte Gene	rRNA, 5S rRNA, tRNAs und Histone
DNA-Sequenzwiederholungen	einfache DNA-Sequenzen moderat wiederholte DNA-Sequenzen (bewegliche DNA): <ul style="list-style-type: none"> - virale Retrotransposons lange terminale Sequenzwiederholungen - LTRs - nichtvirale Retrotransposons lange verstreute DNA-Elemente - LINEs kurze verstreute DNA-Elemente - SINEs
nichtklassifizierte Spacer-DNA	

Nur etwa fünf Prozent der DNA des menschlichen Genoms kodieren Proteine oder funktionelle RNAs. Etwa die Hälfte aller proteinkodierender Gene in der DNA von Wirbeltieren sind singuläre Gene, deren Sequenz in einem haploiden Genom nur einmal vorkommt. Die übrigen Gene sind dublizierte Sequenzen, die aus der Verdopplung eines Stammgens mit anschließenden unabhängigen Mutationen hervorgegangen sind, z.B. β -artige Globulingene. Proteine, die von einer Genfamilie kodiert werden, besitzen homologe aber nicht identische Aminosäuresequenzen und zeigen ähnliche Eigenschaften. Gene einer Genfamilie befinden sich häufig auf einem Chromosom nahe beieinander. Hierbei wurden Sequenzen identifiziert, die in der Exon-Intron-Struktur dem entsprechenden Gen gleichen, jedoch von Mutationen, Insertionen oder Deletionen durchsetzt sind, wie z.B. das humane Immunglobulin V λ (Mighell *et al.*, 2000). Diese Gensequenzen werden als Pseudogene bezeichnet und sind meistens funktionslos.

Tandemartig wiederholte Gene unterscheiden sich von Genen der Genfamilien darin, dass sie identische Proteine oder RNA-Moleküle kodieren. Durch die tandemartige Anordnung der Gene (rRNA, tRNA und Histone) kann die Zelle den hohen Bedarf nach ihren Transkripten decken.

Experimente zur Renaturierung von DNA zeigten, dass sich die eukaryotische DNA in drei große Gruppen einteilen lässt. Etwa 50 bis 60 Prozent der DNA reassoziieren langsam. Dabei handelt es sich um singuläre DNA-Sequenzen, in denen die meisten Gene enthalten sind. 25-40 Prozent renaturieren mit mittlerer Geschwindigkeit. Diese DNA besteht aus sehr vielen Kopien von Sequenzen, die im gesamten Genom verteilt vorkommen und als moderat wiederholend (repetitiv) bezeichnet werden. Etwa 10-15 Prozent renaturieren schnell und bestehen aus kurzen Sequenzen, die sich in langen Folgen wiederholen.

Moderat repetitive Sequenzen können als Kopien an anderen Stellen des Genoms eingefügt werden (Transposition) und werden deshalb auch als bewegliche DNA bezeichnet. Dabei kann die Bewegung über zwei verschiedene Zwischenstufen realisiert werden. Bewegliche DNA-Elemente, die in Form von DNA ins Genom integriert werden, bezeichnet man als Transposons. Wenn bewegliche DNA-Elemente zuerst in eine RNA-Kopie transkribiert, die dann zu DNA rücktranskribiert wird und anschließend die Integration ins Genom erfolgt, bezeichnet man sie als Retrotransposons. Beide Arten erzeugen an der Einfügungsstelle direkte Sequenzwiederholungen, deren Länge von der Art des beweglichen Elements abhängt.

Es werden virale und nichtvirale Retrotransposons unterschieden, wobei bei Säugern die nichtviralen Retrotransposons am häufigsten sind. Ein besonderes Merkmal für virale Retrotransposons stellen die langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTRs) dar. Lange und kurze verstreut liegende Elemente (LINEs und SINEs) sowie eine A/T-reiche Sequenz an einem Ende sind für nichtvirale Retrotransposons charakteristisch.

Einige moderat repetitive DNA-Sequenzen stammen von zellulären RNAs ab, die irgendwann während der Evolution zurückübersetzt und als DNA wieder in das Genom eingefügt wurden. Repetitive Sequenzen, die sich aus mRNA ableiten, bezeichnet man als prozessierte Pseudogene.

1.3.2 Formen der Pseudogene

Pseudogene sind Kopien von Genen, die durch eine hohe Sequenzhomologie gekennzeichnet sind. Die meisten Pseudogene sind nicht funktionell, z.B. 95 Prozent beim Menschen (Harrison & Gerstein, 2002). Das Fehlen der potentiellen Promotorregion und grundlegende Sequenzveränderungen durch Mutationen, Deletionen oder Insertionen verhindern die Bildung von mRNA bzw. die Translation zu einem funktionellen Protein.

Pseudogene resultieren aus einer Gendublikation, die grundlegend auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden kann: durch Retrotransposition oder durch Dublikation genomischer DNA (Abb. 1.8). Beide Mechanismen bringen verschiedene Typen von Pseudogenen hervor.

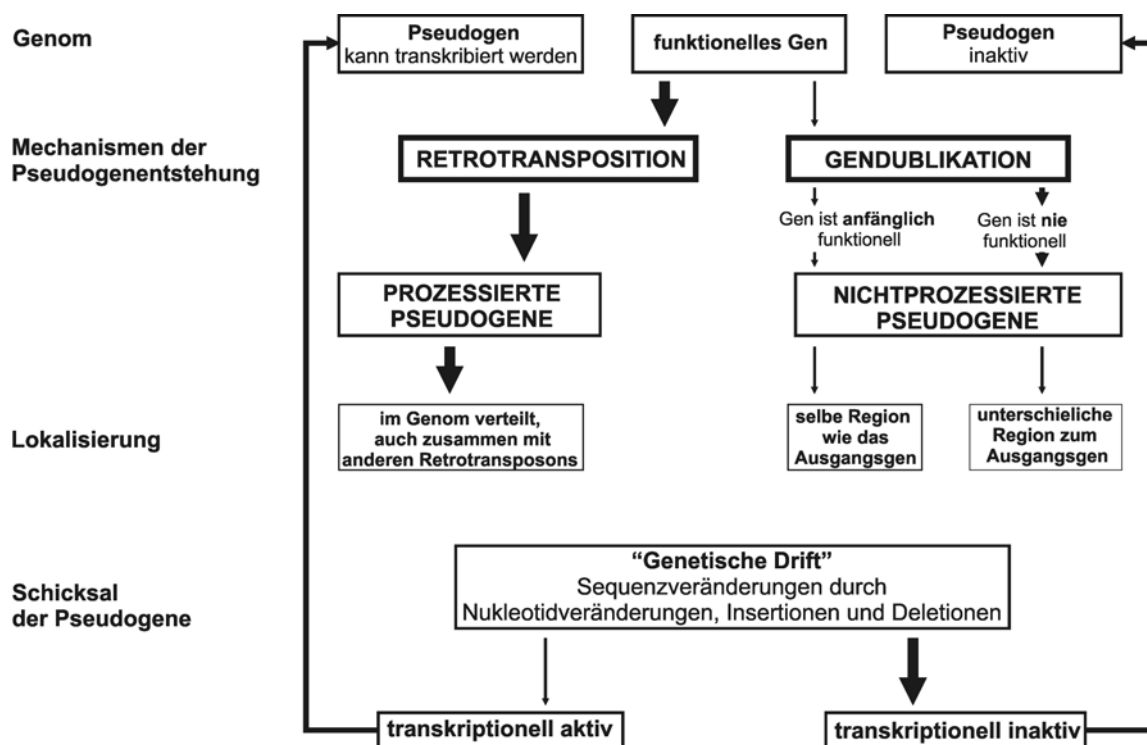


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der Entstehung von Pseudogenen (nach Mighell *et al.*, 2000)

Die Mehrzahl der Pseudogene bei Wirbeltieren sind das Ergebnis der Retrotransposition von mRNA (prozessierte Pseudogene). Pseudogene, die durch Gendublikation entstanden sind (nichtprozessierte Pseudogene) und prozessierte Pseudogene unterliegen einer starken „genetischen Drift“. Sequenzveränderungen führen bei über 95% aller Pseudogene zur funktionellen Inaktivierung. Die restlichen 5% liegen als transkribierbare Pseudogene im Genom vor.

Prozessierte Pseudogene entstehen aus prozessierter mRNA, die nach reverser Transkription als doppelsträngige cDNA wieder ins Genom eingebaut wird (Retrotransposition). Beim Menschen wird davon ausgegangen, dass humane LINE Retrotransposons diesen Prozess bewirken (Esnault *et al.*, 2000; Weiner, 2000). Aufgrund der Entstehung aus mRNA weisen

prozessierte Pseudogene im Vergleich zum Stammgen keine Introns auf, besitzen eine andere 5'-flankierende genomische Region (potentielle Promotorregion), eine hohe Homologie zur mRNA-Sequenz, eine A-reiche Sequenz an ihrem 3'-Ende und werden von kurzen Sequenzwiederholungen (direkt repeats oder Zielsequenzdublikationen-ZSDs) flankiert.

Die Dublikation von genomischer DNA stellt einen essentiellen Prozess für die Entwicklung dar und erklärt die Entstehung von Genfamilien eines Stammgens. Pseudogene, die durch Gendublikation entstanden sind (nichtprozessierte Pseudogene), besitzen eine ähnliche Genstruktur wie das Ausgangsgen, sind jedoch meistens von Sequenzveränderungen durchsetzt, die sie funktionell inaktiv werden lassen.

Die Unterscheidung von Genen und Pseudogenen, insbesondere bei Genfamilien, die sich in der selben Region eines Chromosoms befinden ist nicht immer eindeutig. Die Struktur von prozessierten Pseudogenen dagegen ist, z.B. durch die A-reiche Region, den flankierenden repetitiven Elementen oder durch das Fehlen von intronischen Sequenzen deutlich verschieden zum Stammgen. Die Identifizierung von prozessierten Pseudogenen gestaltet sich daher wesentlich einfacher. Die Analyse des sequenzierten humanen Chromosoms 22 ergab eine Voraussage von 545 Genen und 134 Pseudogenen, also ein Pseudogen auf 4,1 Genen. Dabei stellen 82% der Pseudogene prozessierte Pseudogene dar (Dunham *et al.*, 1999).

Die Verbreitung von prozessierten Pseudogenen hängt häufig mit dem Expressionsniveau der entsprechenden mRNA zusammen (Venter *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2002). Goncalves *et al.* (2000) analysierten 181 Gene für die ein oder mehrere prozessierte Pseudogene detektiert wurden. Sie stellten fest, dass diese Gene häufig klein, hoch konserviert und weit verbreitet sind.

1.4 Ziel der Arbeit

Das ph/snGPx-Gen kodiert für nunmehr drei Glutathion-Peroxidasen, die sich in ihrer Sequenz nur N-terminal voneinander unterscheiden und eine gewebe- und entwicklungs-spezifische Expression aufweisen. Die phGPx wird auf relativ geringem Niveau in den meisten Zellen und Geweben exprimiert, wobei im postpubertären Hoden eine besonders hohe Expression des Proteins zu verzeichnen ist. Im Gegensatz zur phGPx wurde das Transkript für die snGPx nur im Hoden nachgewiesen und die Bildung des Proteins ist auf das letzte Stadium der Spermatogenese beschränkt. Die molekularen Prozesse für eine transkriptionelle oder post-transkriptionelle Aktivierung der snGPx-Expression während der Spermatogenese sowie die Regulation der phGPx-Formen sind noch unklar und bleiben zu untersuchen.

Voraussetzung dafür sind Kenntnisse über die Struktur und Sequenz des ph/snGPx-Gens sowie der 5'- und 3'-flankierenden Regionen. Da das Mausmodell ein leichter zugängliches System für detaillierte Untersuchungen bietet, sollte als erstes das murine ph/snGPx-Gen kloniert werden. Mit Hilfe der so gewonnenen Sequenzinformationen kann durch funktionelle Promotorstudien die potentielle Promotorregion sowohl für die phGPx als auch für die snGPx untersucht werden. Dabei stand die Frage, ob unabhängige Promotorregionen für beide Glutathion-Peroxidasen existieren oder ob eine gemeinsame Promotorregion die Expression beider Formen reguliert. Hierbei sollte auch eine differenzierte Untersuchung der 5'-flankierenden Regionen für die mitochondriale und zytosolische Form der phGPx erfolgen.

Die Regulation der Genexpression erfolgt häufig durch die Bindung von trans-regulatorischen Proteinen an cis-regulatorischen Sequenzen. Eine weitere Aufgabe bestand in der Untersuchung der 5'-flankierenden Region des Exons 1 für die snGPx hinsichtlich funktioneller cis-regulatorischer Elemente, die Einfluss auf die Expressionsregulation ausüben können. Dabei sollte zunächst der Nachweis von DNA/Protein-Interaktionen mit anschließender Identifizierung der bindenden Proteine im Mittelpunkt stehen. Die Einbeziehung weitgehender Bereiche des alternativen Exons 1 für die snGPx könnte Informationen über eine eventuell post-transkriptionelle Regulation durch alternatives Spleißen liefern.

Die Gewebeverteilung der snGPx wurde bisher nur durch Northern Blot-Analyse untersucht. Durch RT-PCR mit snGPx-spezifischen Primern und Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen ph/snGPx-Antikörper sollte die gewebespezifische Verteilung der snGPx auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren

Standardchemikalien in Analysequalität wurden von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und ICN (Eschwege) bezogen. Lösungsmittel und Säuren wurden von Merk (Darmstadt) oder J.T. Baker (Deventer, Holland) bezogen.

Chemikalien	Firma
Agarose	Promega, Heidelberg
DAB Substrate-Kit (10x)	PIERCE, Rockford, USA
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Heringssperma DNA	
CSPD	
Complete, Mini Proteaseinhibitor Cocktail, Tabletten	
Magermilchpulver, Bacto SKIM MILK	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
NADPH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-A-Phosphatidylcholine Typ III-S	
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, USA
Protein-Molekulargewichtsmarker, RPN800, RPN755	Amersham Biosciences, Freiburg
[$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP	
Roti-Load 1	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1)	
Roti-Quant	
Servalyte (3-10; 6-8, 2-4)	Serva, Heidelberg
Western Lightning Chemiluminescence Peagent Plus	Perkin Elmer Life Science, Boston, USA

Gebrauchswaren	Firma
Filterpapier zum Blotten	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulose-Membran	Serva, Heidelberg
Dot-Blot Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Tropilon-Plus, Nylon-Membran	Bedford, USA
Hyperfilm ECL 5x7 inch	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm MP 35x43 cm	
Hybond-N Blotfilter	
Entwickler/Fixierer	Kodak

2.1.2 Geräte

Gerät	Firma
Elektrophoreseeinheit Hoefer, Mighty Small Mini-Vertical Unit	Amersham Biosciences, Freiburg
Röhrchengel-Adaptor für IEF, passend für Elektrophoreseeinheit	Amersham Biosciences, Freiburg
Blot-Kammer, Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseeinheit, Model S2	Life Technologies (Biometra, Göttingen)
Luminometer, Lumat LB9501	Berthold
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Sorvall TC6; Rotor H400	DuPont
Sorvall MC 12V; Rotor-12/M.18	
Eppendorf 5417R	Eppendorf
UV-160A UV-visible spectrophotometer	Shimadzu
UV-2100 UV-visible spectrophotometer	
Flüssigszintillationsmeßgerät, Wallac 1410	Wallac, LKB
Hybridisierungsöfen	MWG BIOTECH
Brutschrank	COTECH, Berlin
Inkubator	COTECH, Berlin
Laminarboxen	STUART SCIENTIFIC, GB
Gelimager	Biometra, Göttingen
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf
Vortex	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Stromversorgungsgeräte	Biometra, Göttingen

2.1.3 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
50X TAE	2 M Tris, 100 mM EDTA Na ₂ , 1 M Essigsäure ; pH 8,1
10X Ladepuffer für DNA-Elektrophorese	0,025% Bromphenolblau, 20% Ficoll 400, 0,1 M EDTA (pH 8,0), 1% SDS
10X TBE	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA
TEN	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM NaCl; pH 8,0
TBS	25 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 5 mM KCl; pH 7,4
5X PBS	7,8 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,815g KH ₂ PO ₄ , 43,83 g NaCl, pH 7,4
RIPA	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Na-deoxycholat, 1% Triton X-100, 0,25 mM EDTA, 1Tab. Proteaseinhibitoren/10ml, pH 7,5
Elutionspuffer (Chromatin-immunopräzipitation)	1% SDS, 0,1 M NaHCO ₃
Ladepuffer (Footprint)	1:2 0,1 M NaOH:Formamid (deionisiert), 0,1% Bromphenolblau

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
5X Bindepuffer (Footprint, Gelshift)	100 mM Hepes, 250 mM KCl, 15,63 mM EDTA, 40% Glycerol, 2,5 mM DTT
Puffer A - Zelllyse (nukleäre Extrakte)	10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA, 0,35 M Sucrose, 0,5 mM DTT, 1Tab. Proteaseinhibitoren/10ml, pH 7,9
Puffer B - Kernextrakt (nukleäre Extrakte)	20 mM Hepes, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, 0,5 mM DTT, 1Tab. Proteaseinhibitoren/10ml, pH 7,9
Acrylamidgel für DNase-I-Footprint (6%-ig)	35,4 g Harnstoff, 11,2 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1), 27 ml destilliertes Wasser, 7 ml 10X TBE, 329 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat, 59,5 µl TEMED
Gelshift	2,5 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 1,125 ml 40% (w/v) Acrylamid, 1,2 ml 10X TBE, 19,18 ml destilliertes Wasser, 20 µl TEMED, 240 µl Ammoniumpersulfat
SDS-12,5% Trenngel	5 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 3 ml Trenngelpuffer, 4 ml H ₂ O (bidest.), 20µl TEMED, 120µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
SDS-4% Sammelgel	1,35 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6 ml H ₂ O (bidest.), 20µl TEMED, 100µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
IEF	2,96 g Harnstoff, 540µl Acrylamid-Stammlösung, 1080µl 10% (w/v) Triton X100, 1350µl H ₂ O (bidest), 360µl Servalyt 3-10, 90µl/ml Sevalyt 6-8, 54µl/ml Servalyt 2-4, 16µl TEMED, 20µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
SDS-Elektrophorese	
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,7
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,6% SDS, pH 8,8
5X Elektrophoresepuffer	125 mM Tris, 100 mM Glycin, 17 mM SDS
Blot	
Anodenpuffer I	0,3 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol
Anodenpuffer II	0,025 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol
Kathodenpuffer	0,025 M Tris pH 9,4, 0,040 M 6-Aminocaprinsäure
Coomassiefärbung	
Coomassie-Lösung	0,2% (w/v) Coomassiebrillantbau in 10% Methanol, 20% Essigsäure (v/v)
Entfärber-Lösung	40% Methanol, 10% Essigsäure, 50% H ₂ O (bidest.) (v/v/v), 20% Methanol
Isoelektrische Fokussierung (IEF)	
Probenpuffer	1,43 g/ml Harnstoff, 10 mg/ml DTT, 10% (w/v) Triton X-100, 107µl/ml Servalyt 3-10, 26 µl Servalyt 6-8, 16 µl/ml Servalyt 2-4
Überschichtungslösung	0,55 g/ml Harnstoff, 40 µl/ml Servalyt 3-10, 26 µl Servalyt 6-8, 14 µl/ml Servalyt 2-4
Anodenpuffer	10 mM H ₃ PO ₄
Kathodenpuffer	20 mM NaOH
Agaroselösung	0,4 g Agarose, 0,4 ml 10% (w/v) SDS, 10 ml
Acrylamid-Stammlösung	40% (w/v) Acrylamid-Stammlösung: 38% (w/v) Acrylamid, 2% (w/v) Methylenbisacrylamid

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Immunohistochemie	
1. PBS (Phosphate Buffered Saline):	100 ml PBS-Stammlösung (Lsg 2) auf 1L mit Aqua bidest auffüllen.
2. PBS-Stammlösung:	200 g Natriumchlorid (MW 58,4), 5 g Kaliumchlorid (MW 74,5), 35 g Natriumdihydrogenphosphat x H ₂ O (MW 137,99) und ca. 5 g Natriumhydroxid (MW 40,0) werden in ca. 2 L Aqua bidest gelöst. Der pH-Wert wird dann mit 10 N NaOH auf 8,1 eingestellt, die Lösung mit Aqua bidest auf 2,5 L aufgefüllt und der pH-Wert noch einmal kontrolliert.
3. Reduktionslösung (1 % NaBH ₄)	1 g NaBH ₄ werden in 100 ml PBS gelöst (pH-Wert steigt auf 9,5).
4. PBS-A Stocklösung (10% FCS in PBS)	2 g BSA oder 2 ml FCS (Sigma A-7030, Biochrom) in 20 mL PBS (10% BSA in PBS).
5. PBS-A (PBS mit 1% FCS):	2 mL PBS-A-Stocklsg. (Lsg 4) werden mit 18 mL verdünnt.
6. 10 % NGS:	1 mL normal Ziegenserum (NGS) wird mit 9 mL PBS versetzt und gemischt.
7. 10 % NGS-PhT:	0,3 mL Triton Stocklösung (Triton X-100, Serva 37240, 10 % in H ₂ O) zu 9,7 mL 10 % NGS (Lsg 6) zusetzen, 5 µL Phenylhydrazin (Merck) zufügen und mischen, bis das Phenylhydrazin vollständig gelöst ist.
8. NaN ₃ -Stocklösung:	10 % Natriumazid (Sigma) in H ₂ O
9. 10 % NGS-TAT:	0,3 mL Triton-Stocklösung (10 %) zu 9,7 mL 10 % NGS zusetzen, 100 µL NaN ₃ Stocklösung und 100 µL Thimerosal-Stocklösung (Sigma, 1 % in H ₂ O ₂) zufügen und mischen.
10. 1. AK-Lösung (MAK-ph/snGPx):	Der Erstantikörper wurde in NGS-TAT (Lsg 9) 1.200 verdünnt.
11. 2. AK-Lösung biotinyliert:	5 µL des Anti-Maus IgG und 100 µL NaAzid-Stocklösung werden zu 10 mL PBS-A zugesetzt und gemischt.
12. ABC-Komplex (1:1000):	10 µL Lsg Elite A (Avidin H, ABC-Elite Kit, Vector) mit 10 mL PBS-A mischen, dann 10 µL Lsg Elite-B (Biotinyl-Peroxidase) zugeben, erneut mischen und bis zum Inkubationsbeginn 30 min im Dunkeln stehen lassen.
13. Tris-Stocklösung (1 M):	12,2 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan (MW 121,1, Sigma) werden in 100 mL H ₂ O gelöst, der pH mit 10 N HCl auf 7,6 eingestellt.
14. Imidazol-Stocklösung (1 M):	681 mg Imidazol (MW 68,1, Sigma) werden in 10 mL H ₂ O gelöst (pH 10,4) und der pH mit 300 µL 10 N HCl auf 7,6 eingestellt.
15. 5% DAB-Stocklösung (50 mg/mL):	50 mg DAB (3'3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Sigma) werden in 1 mL H ₂ O gelöst. Bei -20°C aufbewahren, möglichst nur kurz dem Licht aussetzen.
16. Vorinkubationslösung:	500 µL Tris-Stocklösung (Lsg 13), 100 µL Imidazol-Stocklösung (Lsg 14) und 100 µL DAB-Stocklösung (Lsg 15) werden zu 9,5 mL H ₂ O zugegeben und gemischt. DAB in der Endkonzentration 0,05%.
17. 3% Ammonium-nickelsulfat:	3 g Ammoniumnickelsulfat (Fluka) in 100 mL H ₂ O unter Bewegen lösen.
18. Inkubationslösung:	0,5 mL Vorinkubationslösung (Lsg 16) direkt vor Reaktionsbeginn mit 50 µL 3% Ammoniumnickelsulfat versetzen und die Reaktion durch Zugabe von 25 µL 0,03% H ₂ O ₂ starten. Nach 3-10 Minuten stoppen.

Nährmedien	Zusammensetzung
Zellkultur	
HEK293	Dulbecco's Mod Eagle Medium (31885-023); Invitrogen (Karlsruhe) 10% Fötales Kälberserum; Sigma (Deisenhofen) 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, Sigma (Deisenhofen) Dulbecco's PBS 1x (1x DPBS); Invitrogen (Karlsruhe)
Bakterien	
LB-Medium	1% Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA), 0,5% Hefe-Extrakt (Difco, Detroit, USA) 0,5% NaCl, 1 mM NaOH, 100mg/l Ampicillin,
LB-Agar	1,5% Bacto-Agar, 1% Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA), 0,5% Hefe-Extrakt (Difco, Detroit, USA) 0,5% NaCl, 1 mM NaOH, 100mg/l Ampicillin,
SOC-Medium	2% Bacto-Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose

2.1.4 Enzyme und Kits

Enzyme	Firma
Pwo DNA-Polymerase	ROCHE Diagnostics, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	
PANscript DNA-Polymerase	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Advantage 2 Polymerase	CLONTECH, Palo Alto, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase	ROCHE Diagnostics, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	Promega, Mannheim
RQ1 RNase-freie DNase (1U/μl)	
Alkalische Kälberdarm-Phosphatase	
Glutathion Reduktase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kits	Firma
ECL TM direct nucleic acid labelling and detection system	Amersham Pharmacia biotech, England
RPN 3000	
pBlue-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
β-Gal Assay Kit	
Calcium Phosphate Transfektion Kit	
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Core Footprinting System	
DNA 5' End-Labeling System	
DIG Gel Shift Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNeasy Mini oder Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	
QIAprep Spin Miniprep	
Plasmid Midi Kit	
Qiagen Lambda Midi Kit	
QIAquick PCR Purification Kit	

2.1.5 DNA-Banken und Plasmide

Maus Fibroblasten 5'-STRECH PLUS cDNA Bibliothek CLONTECH, Palo Alto, USA
 Genomische Maus DNA Bibliothek (Leber) CLONTECH, Palo Alto, USA

Plasmide	Firma
pGEM-T Klonierungsvektor	Promega, Mannheim
pGL3, Luciferase Kontrollvektor	
pBluescript II SK Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
Litmus29 Klonierungsvektor	New England Biolabs, Schwalbach
pCR 4-TOPO Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pBlueTOPO β -Galactosidase Reporter Vektor	
pcDNA3-1/His/LacZ, β -Galactosidase Kontrollvektor	
pKO scrambler V920	LEXICON GENETICS, Texas, USA

2.1.6 Bakterienstämme und Zellen

Bakterien: Escherichia coli TOP10
 Y1090⁻
 K802

Zelllinie: humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293), DSM ACC 305 Zelltyp
 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.1.7 Antikörper

Antikörper (AK)	Antigen	gezogen in	reaktiv mit	Firma
Monoklonaler anti-phGPx-AK	humane phGPx Sec46Cys Mutante	Maus	phGPx -Mensch, Maus, Ratte	BIOTEZ GmbH, Berlin
Polyklonaler anti-Egr1 (588)-AK	Egr1	Kaninchen	Egr1 – Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Polyklonaler anti-SREBP1-AK (H-160)	SREBP1	Kaninchen	SREBP1 – Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Polyklonaler anti-WT-AK (C-19)	humanes WT	Kaninchen	WT – Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Peroxidase markiertes Anti-Maus IgG	IgG	Ziege	IgG- Maus	Sigma, Deisenhofen

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für grundlegende molekularbiologische Methoden wie z.B. DNA/RNA-Präparationen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA, Agarosegel-Elektrophorese, Ligationen, Transformationen in *E.coli*, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen oder Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurde entsprechend der Produktinformationen und Vorschriften des Herstellers gearbeitet. Für die durchgeführten Polymerasekettenreaktionen wurde folgendes Standardprogramm als Grundlage genommen.

1. Vordenaturierung	95°C	4 min	29 – 35 Zyklen
2. Denaturierung	95°C	40 s	
3. Annealing	Primer spezifisch	60 s	
4. Elongation	72°C	2 min	
5. Nachelongation	72°C	10 min	
6. Aufbewahrung	4°C	Pause	

Weiterhin kamen Standardprotokolle aus der Literatur zum Einsatz (Sambrock *et al.*, 1989).

Die erforderlichen Sequenzierungen wurden von der Firma InViTek (Berlin) oder von Frau Bürger (Institut für Biochemie) durchgeführt.

2.2.1 Rechnergestützte Sequenzanalyse

Für die Herstellung genspezifischer Primer, für Sequenzvergleiche, Umschreibung von DNA in Protein oder die Erstellung von Restriktionskarten wurde das Programm „DNAssist“ genutzt. Das Programm „MatInspector“ (<http://genomax.gsf.de>) ermöglicht eine definierte DNA-Sequenz auf potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Das Programm greift auf eine Datenbank zurück, in der Konsensus-Bindesequenzen (core-Matrix) für bekannte Transkriptionsfaktoren gespeichert sind und gibt die Kernsequenz-Ähnlichkeit in Prozent an.

2.2.2 Screening von DNA-Banken

2.2.2.1 Screening einer Maus cDNA-Fibroblasten-Bank nach der phGPx-cDNA

Das Screening der murinen cDNA-Bank orientierte sich am Firmenprotokoll von CLONTECH.

Da die Sequenzhomologie zwischen den bereits bekannten phGPx-cDNAs von Mensch, Schwein und Ratte bei über 90% liegt, konnte von einer hohen Konservierung zwischen den

verschiedenen Spezies ausgegangen werden. Somit fand ein Fragment der humanen phGPx (Sma I/PpuM I) von 480 bp als Sonde Verwendung, das einen Teil des kodierenden Bereichs darstellte.

Das Markieren der Sonde und die Detektion erfolgten mit dem ECLTM direct nucleic acid labelling and detection system RPN 3000.

Für den Primärscreen wurden zehn 150 mm Kulturschalen mit je 30.000 Plaques ausplattiert. Nach Primär-, Sekundär und Tertiärscreen mittels Plaque-Lift-Hybridisierung entsprechend den Anweisungen des Herstellers (CLONTECH), gelang die Isolierung von drei phGPx-positiven cDNA-Klonen. Die Präparation der Lambda-DNA wurde anhand der Protokolle des QIAGEN Lambda Handbuches durchgeführt.

Die entsprechenden phGPx-Phageninserts wurden über die Restriktionsorte EcoR I und BamH I in den pBluescript II SK-Plasmidvektor umklontiert.

2.2.2.2 Screening einer genomischen Maus-Bank nach dem murinen phGPx-Gen

Um Sequenzinformationen über das murine phGPx-Gen zu erhalten, wurde eine genomische Maus Bank gescreent. Diese wurde aus BamH I-Fragmenten genomischer Leber DNA durch Klonierung in den EMBL3 SP6/T7 - Phagen erstellt (CLONTECH). Die Insertgröße betrug 8-22 kb.

Die technische Vorgehensweise, ist dem Kapitel 2.2.2.1 zu entnehmen. Für die Sondenpräparation wurde die subklonierte Maus phGPx-cDNA aus der Fibroblasten-Bank genutzt. Dabei kamen zwei Spaltfragmente zum Einsatz: ein EcoR I/Nhe I-Fragment von 467 bp und ein Nhe I/EcoR I-Fragment von 258 bp.

Im Primärscreen von 210.000 Plaques konnten acht positive Rekombinaten detektiert werden. Die Identifizierung des murinen phGPx-Gens erfolgte mit Hilfe der PCR. Die isolierten Plaques wurden in 100 µl Lambdapuffer resuspendiert und bei 14.000 rpm kurz zentrifugiert. Für die PCR kamen 5-10 µl des Überstandes und die Primerkombination G+H zum Einsatz. In Tabelle 2.1 sind alle verwendeten phGPx-spezifischen Primer und ihre Position im phGPx-Gen zusammengefasst. Die PCR wurde nach dem Standardprogramm (Abschnitt 2.2) bei einer Annealingtemperatur von 67°C und 30 Zyklen durchgeführt.

Tab. 2.1 phGPx-spezifische Primer, die für die PCR-Charakterisierung der positiven Rekombinanten aus der genomischen Bank eingesetzt wurden

	phGPx-spezifische Primer	Position im ph/snGPx-Gen
A	5'-GTG CAT CCC GCG ATG ATT GGC G-3'	Exon 2
B	5'-GCC TCC CAA ACT GGT TGC AGG G-3'	Exon 3
C	5'-GGG TTT CGT GTG CAT CGT CAC CA-3'	Exon 3
D	5'-TTT CCC AGC ATG CCC CTG CCC T-3'	Exon 4
E	5'-TTC TCA TTG ATA AGA ACG GCT GCG T-3'	Exon 6
F	5'-TTT TAT TCC CAC AAG GCA GCC AGG-3'	Exon 7
G	5'-ACA TCG ACG GGC ACA TGG TCT GCC TGG AT-3'	Exon 2
H	5'-CCA ACG TGG GTG GGC ATC GTC CCC ATT TAC-3'	Exon 4

Die Primer wurden anhand der Sequenz der gescreenten Maus phGPx-cDNA hergestellt. Nach Sekundär- und Tertiärscreen erfolgte die Subklonierung des murinen phGPx-Gens in die BamH I-Seite des pBluescript II SK-Plasmidvektors.

2.2.3 Chromosomale Lokalisierung

Die chromosomale Lokalisierung der isolierten phGPx-Rekombinanten wurde mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestimmt. Die technische Durchführung erfolgte von der Firma SeeDNA BIOTECH INC (Kanada).

Um geeignete Sonden für die chromosomale Lokalisierung der einzelnen Rekombinanten zur Verfügung zu stellen, wurde für das Pseudogen 1 ein BamH I/Xho I-Fragment des isolierten EMBL3 SP6/T7 Phagen von ca. 3,6 kb in den pKO-Plasmidvektor subkloniert. Dieses Fragment enthielt zum größten Teil die 5'-flankierende Region des Pseudogens 1. Für das Pseudogen 2 kam ein subkloniertes BamH I-Fragment von ca. 3,9 kb zum Einsatz. Dabei handelte es sich um die 3'-flankierende Region des Pseudogens.

Für die chromosomale Kolokalisierung von Pseudogen 1 und des ph/snGPx-Gens wurde neben der oben genannten Sonde des Pseudogens 1 ein subkloniertes BamH I-Fragment des ph/snGPx-Gens von ca. 6 kb eingesetzt. Dieser genomischer Sequenzabschnitt enthielt weite Bereiche der 5'-flankierenden Region des Gens.

Die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgte nach folgenden Protokollen.

Vorbereitung der Objektträger

Aus der Maus-Milz isolierte Lymphozyten wurden in RPMI 1640 Medium mit 15% FCS, 3 µg/ml Concanavalin A, 10 µg/ml Lipopolysaccharid und 5x 10⁻⁵M Mercaptoethanol bei 37°C kultiviert. Nach 44 h wurden die Zellen für weitere 14 h mit 0,18 mg/ml BrdU

behandelt. Die synchronisierten Zellen wurden gewaschen und in α -MEM mit Thymidin (2,5 μ g/ml) für 4 h bei 37°C rekultiviert. Die Herstellung der Chromosomenobjekttäger erfolgte nach konventionellen Methoden (hypotonische Behandlung, Fixierung und Lufttrocknung).

Markieren der Sonde und in situ Hybridisierung

Das Markieren der DNA Sonden erfolgte mit Biotin entsprechend den Protokollen des Gibco BRL BioNick labeling Kits.

Die *in situ* Hybridisierung wurde entsprechend den Vorschriften nach Heng *et al.*, 1992 und Heng & Tsui, 1993 durchgeführt.

Für die chromosomale Kolo-kalisierung wurde die Sonde für das Pseudogen 1 mit dATP biotinyliert und die Sonde für das phGPx-Gen mit Digoxigenin markiert (Heng und Tsui, 1994).

2.2.4 Funktioneller Promotor Assay

2.2.4.1 Konstruktion der Reportergene

Um die spezifische Aktivität potentieller Promotorsequenzen in Zellen zu untersuchen, wurden Reportergene hergestellt. Dabei kam der pBlueTOPO-Reportervektor (Invitrogen, Karlsruhe) zum Einsatz. Die Herstellung der entsprechenden Reportergene orientierte sich am Firmenprotokoll von Invitrogen. Bei diesem System wurde mit Hilfe der Topoisomerase I PCR-Produkte potentieller Promotorregionen (mit 3' Deoxyadenosin-Überhängen A) in den linearisierten Vektor (mit entsprechenden 3' Deoxythymidin-Überhängen T) vor das β -Galaktosidasegen (lacZ) kloniert. Als Template für die PCR diente gereinigte Plasmid-DNA des subklonierten murinen ph/snGPx-Gens. Die PCR wurde nach Standardprotokollen bei einer Annealingtemperatur von 67°C durchgeführt. Als DNA-Polymerase diente eine Taq-Polymerase (PanScript DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*), die das erforderliche Deoxyadenosin (A) an die 3'-Enden des PCR-Produkts anhängt. Die genutzten Primer sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 2.2 Für Reporter-Gen-Konstrukte erforderliche ph/snGPx-spezifische Primer

Reporter-Gen	ph/snGPx-Primer
A1/B1/C1 up	5' -CGC GTC CCT ATC ACT GGG CAT G-3'
A2/B2/C2 up	5' -CCC AAA GCG CCC TGG CAC CCT-3'
A3/B3/C3 up	5' -GGC CGA CAC CGA GAT CCC AGC-3'
A4/B4/C4 up	5' -AAG CTA CAT CTG GGG TTC GGG AC-3'
A5 up	5' -GGC AAT GGC TTT CTC ACC AAG CC-3'
A6 up	5' -AGA GTG TGA CCA CTA GGC CCA TC-3'
B0/C0 up	5' -GAG GGG CCT CGC GTC TTA GCG-3'
D1 up	5' -TGG GCT ACT GGG AAC TTG GAG GA-3'
D2 up	5' -CGC GTC CCT ATC ACT GGG GCA TG-3'
A do	5' -CGC TAA GAC GCG AGG CCC CTG-3'
B do	5' -AGC CAG CGG CTC CTC CCC TCA-3'
C do	5' -TGG TGC CTG CCA GAC CAG GCG-3'
D do	5' -ATG CCC GCC GGT CTG TGC GTC-3'

Nach Transformation der Ligationsprodukte und Isolierung der entsprechenden DNA (Qiagen, Hilden) wurde die Orientierung der PCR-Inserts durch Kontrollspaltungen mit geeigneten Restriktionsendonukleasen festgestellt. Bei den Reporter-Gen-Konstrukten mit richtiger Orientierung der eingefügten genomischen Sequenzen erfolgte eine zusätzliche Kontrolle durch Sequenzierung.

Die so hergestellten, durch Restriktionsspaltung und Sequenzierung überprüften Reporter-Gen-Konstrukte, konnten für die Transfektion in Zellen eingesetzt werden.

2.2.4.2 Transiente Transfektionsanalysen

Die Transfektion erfolgte mit dem Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Bei dieser Methode wurde die Fremd-DNA zunächst in eine Kalziumchloridlösung gegeben und dann mit einem phosphathaltigen Puffer gemischt. Dabei entstanden DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitate, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können. Für die Transfektion wurde die humane embryonale Nierenzelle 293 (HEK293) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine sich rasch teilende und adhärent wachsende Zelle, die gut für Transfektionsuntersuchungen geeignet ist. Sowohl die mRNA der phGPx als auch die der snGPx konnten in dieser Zelllinie nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass alle grundsätzlich notwendigen Transkriptionsfaktoren in dieser Zelle exprimiert werden.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen frisch ausgesät (1×10^6 Zellen / 100 mm Kulturschalen oder $0,5 \times 10^6$ Zellen / 60 mm Kulturschalen). Am nächsten Tag erfolgte 3-4 h vor der Transfektion ein erneuter Mediumwechsel. Die Zellen waren zu 50-70% konfluent. Für die 60 mm Kulturschalen wurden je 10 µg der Reporter-Gen-DNA und für die 100 mm

Kulturschalen je 20 µg entsprechend der Vorschrift transfiziert. Als Positivkontrolle diente anstatt der konstruierten Reportergene der β -Galaktosidase-Kontrollvektor (pcDNA3-1/His/LacZ). Der religierte pBlueTOPO-Vektor ohne promotoraktive Sequenz wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Da die Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen Schwankungen unterworfen ist, wurden 5 µg / 60 mm Kulturschale bzw. 10 µg / 100 mm Kulturschale eines Luciferase-Kontrollvektors (pGL3) kotransfiziert. Die weitere Behandlung der transfizierten Zellkulturen erfolgte entsprechend der Vorschrift.

72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Nach dem Waschen der Zellen mit 1x DPBS, Abspülen der Zellen und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zellyse. Dafür wurden die entsprechenden Zellpellets in 50 µl 1x Reporter-Lysepuffer (Luciferase-Assay Kit, Promega) resuspendiert und anschließend durch 1x Frieren/Tauen (Trockeneis / 37°C Wasserbad) aufgeschlossen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde für 15 s auf einem Vortex-Gerät geschüttelt und 30 s und 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

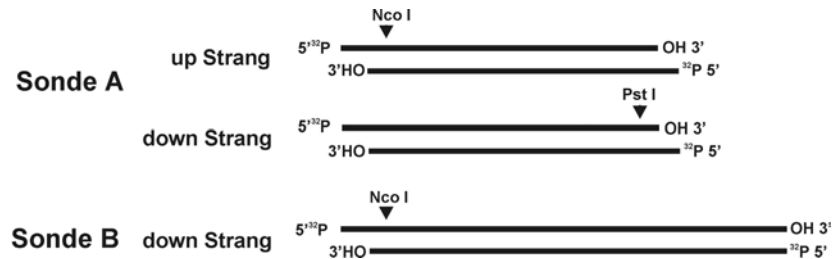
Der Überstand diente zur Ermittlung der β -Galaktosidase-Aktivität (β -Gal Assay Kit, Invitrogen), der Luciferase-Aktivität (Luciferase-Assay-System, Promega) und der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde über die bestimmte Transfektionseffizienz (mittels Luciferase-Aktivität der einzelnen Ansätze) normalisiert.

2.2.5 DNase-I-Footprint Analyse

Das Auftreten von DNA/Protein-Kontaktpunkten lässt sich durch DNase-I-*in vitro*-Footprint Analysen nachweisen. Dafür sind doppelsträngige DNA-Sonden erforderlich, die nur an einem Ende markiert sind.

Um geeignete DNA-Abschnitte zu präparieren, wurde ein Nco I / Pst I-Fragment des genomischen ph/snGPx-Gens in den Litmus29-Klonierungsvektor subkloniert. Dieses Fragment schließt die Region zwischen dem Exon 1a und dem Intron 3 ein. Für die Präparation der Sonde A diente ein Xba I / BamH I-Fragment, das zum größten Teil das Intron 1a enthält. Für die Präparation der Sonde B kam ein Xba I / Sca I-Fragment zum Einsatz, welches das Intron 1a und einen Großteil des Exons 1b enthielt.

Das Markieren der Sonde erfolgte an beiden Enden des DNA-Stranges mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP durch eine T4-Kinase entsprechend den Anweisungen des Core Footprinting Systems von Promega. Anschließend wurde mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease ein markiertes Ende entfernt. Für die eingesetzten Sonden A und B wurden folgende Restriktionsenzyme genutzt:



Die so erhaltenen Sonden wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN; Hilden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers gereinigt und umgepuffert. 1 μl der eluierten und an einem Ende markierten DNA-Sonde wurde in 5 ml Scintillationslösung an einem Wallac 1410 Flüssigszintillationscounter für 60 Sekunden gemessen.

Die DNA/Protein-Komplexbildung erfolgte durch die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (10.000-20.000 cpm) zur Reaktionsmischung, die sich wie folgt zusammensetzte: 40 mM Hepes-Puffer, pH 7,9, 100 mM KCl, 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 1 μg poly(dI-dC) und 50-100 μg der nukleären Proteine in einem Gesamtvolumen von 50 μl . Als Kontrolle diente dieser Ansatz ohne nukleäre Proteine. Um unspezifische DNA/Protein-Wechselwirkungen auszuschließen, wurde ein Ansatz mit 100 μg BSA anstatt nukleärer Proteine inkubiert.

Die jeweiligen Ansätze wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 50 μl 5 mM CaCl_2 /10 mM MgCl_2 - Lösung versetzt. Der DNA-Verdau erfolgte in Abhängigkeit von der Menge der zugesetzten nukleären Proteine mit 2-5 U DNase I. Der Reaktionsansatz wurde nach Inkubation für 5 Minuten auf Eis mit 100 μl Stopp-Lösung, die auf 37°C temperiert wurde, versetzt. Nach Zugabe von 4 μl einer 5 M NaCl-Lösung erfolgte die Extraktion der DNase I-Produkte mit je 200 μl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1). Die Ansätze wurden für eine Minute mit einem Vortex-Gerät gemischt und anschließend für 3 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 μg Glykogen und 500 μl Ethanol (96%) zur separierten oberen wässrigen Phase, erfolgte die DNA-Fällung bei -20°C über Nacht. Diese Ansätze wurden anschließend bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Pellet 1x mit 70 % -igen Ethanol gewaschen.

Das luftgetrocknete Pellet konnte nach Resuspension in 10 µl Ladepuffer und anschließender Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C und mindestens 2-minütiger Inkubation auf Eis mit einem 6% -igen Acrylamid-Sequenziergel analysiert werden. Vor dem Auftragen der Proben erfolgte ein Vorlauf des Analysegeles für 30 min bei 1.400 V und 50 mA. Anschließend wurden die aufgetragenen Proben bei 1.400 V und 50 mA in 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Dabei kam die Elektrophoresevorrichtung Model S2 der Firma Life Technologies zum Einsatz.

Das Gel wurde anschließend durch 30-minütige Inkubation in 20% -iger Essigsäure und zweimaligen Spülen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten fixiert. Nach Trocknung bei 80°C im Trockenschrank erfolgte die Exposition der Autoradiogramme bei -80°C für 72 bis 96 Stunden. Als Film kam der Hyperfilm MP 35 x 43 cm der Firma Amersham Pharmacia Biotech zum Einsatz. Die Entwicklung und Fixierung des Film wurde in den entsprechenden Kodak-Lösungen für je 5 Minuten durchgeführt.

Um die genaue Position der DNA/Protein-Kontaktpunkte des analysierten DNA-Fragments zu bestimmen, erfolgte eine chemische Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977). Die Behandlung der DNA-Sonden mit Ameisensäure und Piperidin führten zu einem G+A - Muster. Diese Spaltprodukte wurden parallel zu den DNase I verdauten Ansätzen aufgetragen und ein Vergleich der aufgetrennten Banden mit dem Leerverdau und der bekannten DNA-Sequenz lässt eine genaue Bestimmung der Sequenzpositionen der Footprints zu.

Die einseitig markierte Footprintsonde (6 ng, ca. 70.000 cpm) wurde mit 1 µg Heringssperma-DNA und 1 µl 4% -iger Ameisensäure in einem Gesamtvolumen von 11 µl für 25 min bei 37°C in TE-Puffer inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gestellt und mit 150 µl einer frisch hergestellten 1 M Piperidin-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 90°C und weiteren 5 Minuten auf Eis erfolgte die Extraktion der entstandenen Spaltprodukte mit 1 ml n-Butanol. Der Ansatz wurde intensiv gemischt und 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 150 µl einer 1% -igen SDS-Lösung und 1 ml n-Butanol versetzt, intensiv gemischt und weitere 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgten 2 Waschschrte mit jeweils 0,5 ml n-Butanol. Das luftgetrocknete Pellet konnte nach Resuspension in 10 µl Ladepuffer analog der DNase I verdauten Proben mit einem 6% -igen Acrylamid-Sequenziergel analysiert werden.

2.2.6 Gelshift Assay

Für die im DNase-I-Footprint nachgewiesenen DNA/Protein-Kontaktpunkte sollte die Identifizierung der bindenden Proteine folgen. Eine geeignete Methode dafür stellt der Gelshift Assay dar. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass in einer Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen gebildete DNA/Protein-Komplexe langsamer laufen als die entsprechenden freien DNA-Moleküle.

Anhand der im Footprint nachgewiesenen DNA/Protein-Kontaktpunkte wurden komplementäre Oligonukleotide hergestellt. In folgender Tabelle ist jeweils der up-Strang dargestellt.

Tab. 2.3 Eingesetzte Gelshift-Oligonukleotide (up-Strang)

Gelshift-Oligonukleotide	
Footprint 1 (FP 1)	5' -TTG GAG GAT CGC GGG TGG GGG CGG GGT TCG GAG TC-3'
Footprint 2 (FP 2)	5' -AAG CGG AGC CTG ATA GGC ATC TCC GGG GTT GAA CA-3'
Footprint 3 (FP 3)	5' -TTG GGC GGT GAG AAC CGG TGTBCGG GGT CAG CAT AGC GGG C-3'
Footprint 4 (FP 4)	5' -GCG GGC TCT GAC CTG GTC ACG CGC CCT GCC CGG CC-3'
Footprint 5 (FP 5)	5' -TGC CCG GCC TGG TGC GTC ACA GTC GGC GGC GCC TT-3'
Footprint 6 (FP 6)	5' -GCG CGC GCC GCC GCA GGA GGG CGC GCC CTC GCC GG-3'

Um im Gel DNA/Protein-Komplexe nachweisen zu können, wurden die entsprechenden komplementären Oligonukleotide dimerisiert und mit Digoxigenin markiert. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Protokollen des DIG Gel Shift Kits (Roche Diagnostics, Mannheim).

Für die Bildung von DNA/Protein-Komplexen wurde die markierte Sonde (je 48 fmol doppelsträngiges Oligonukleotid) in einem Reaktionsansatz mit 40 mM Hepes, pH 7,9, 100 mM KCl, 12,5 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 1-2 µg poly (dI-dC), 0,1-0,2 µg poly-(L)-lysine und 10 µg nukleärem Extrakt in einem Gesamtvolumen von 15 µl für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kontrolle diente der Inkubationsansatz ohne nukleären Extrakt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (5% -ig, 8x9cm) in 0,5X TBE-Puffer bei 200 V und unter Wasserkühlung oder bei 4°C. Anschließend wurden die DNA/Protein-Komplexe durch Kontaktblotting (1 h) auf eine Nylonmembran übertragen (Tropilon-Plus). Die Detektion erfolgte mit dem DIG Gel Shift Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Chemilumineszenzsignale wurden durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL 5x7 inches, Pharmacia Amersham Biotech) für 40 bis 90 Minuten detektiert

Um nachzuweisen, dass die beobachteten verschobenen Banden wirklich spezifische DNA/Protein-Komplexe darstellen, wurde neben dem markierten Oligonukleotid ein großer Überschuss (166fach molar) des nicht markierten Oligonukleotides zugesetzt. Die unmarkierten DNA-Moleküle konkurrieren um die Bindung des entsprechenden Proteins. Bei genügend großen Überschuss kommt es daher zur deutlichen Abschwächung bzw. zur Aufhebung der beobachteten verschobenen Bande (Kompetition). Zur Identifizierung der bindenden Proteine wurden des weiteren Versuche mit Konsensus-Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei handelt es sich um synthetische Oligonukleotide, die das spezifische Bindemotiv (Konsensussequenz) bekannter Transkriptionsfaktoren enthalten und somit um das entsprechende Protein konkurrieren können. Bei genügend großem Überschuss kommt es auch hier zur Abschwächung bzw. Aufhebung der beobachteten verschobenen Bande.

In folgender Tabelle sind die up-Stränge der eingesetzten Konsensus-Oligonukleotide zusammengefasst.

Tab. 2.4 Konsensus-Oligonukleotide für verschiedene Transkriptionsfaktoren bzw. deren Familien

	Konsensus-Oligonukleotide
SP1	5' -ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3'
EGR-Familie	5' -GGA TCC AGC GGG GGC GAG CGG GGG CGA-3'
GATA-Familie	5' -CAC TTG ATA ACA GAA AGT GAT AAC TCT-3'
FAS SREBP1	5' -CAT CCG GCA TCA CCC CAC CGA CGG CG-3'
USF1	5' -CAC CCG GTC ACG TGG CCT ACA CC-3'
CREB-Familie	5' -AGA GAT TGC CTG ACG TCA GAG AGC TAG-3'

Im Supershift-Assay wird versucht, die Beteiligung bestimmter Proteine an einem Bandshift-Komplex mit Hilfe der entsprechenden spezifischen Antikörper nachzuweisen. Ist der fragliche Transkriptionsfaktor tatsächlich an dem DNA/Protein-Komplex beteiligt, erhält man durch Zugabe des Antikörpers einen Supershift, d.h. eine oberhalb des ursprünglichen Komplexes liegende Bande. In vielen Fällen ist die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA durch die Reaktion mit dem Antikörper stark beeinträchtigt, so dass es nur zur Auflösung des Bandshift-Komplexes kommt.

Bei den Kompetitionsexperimenten erfolgte die Zugabe des entsprechenden Oligonukleotides im 166fachen molaren Überschuss und wurde 10 min auf Eis inkubiert, bevor das markierte Oligonukleotid zugesetzt wurde. Für den Supershift-Assay erfolgte die Vorinkubation mit dem Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) für eine Stunde auf Eis.

2.2.7 Chromatin Immunopräzipitation

Mit dieser Methode können in Zellsystemen *in vivo*-Bindungen von Proteinen an genomischer Kern-DNA nachgewiesen werden.

Zuerst erfolgte der DNA/Protein-Crosslink in HEK293 Zellen. Dafür wurden 10^7 Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 1% Formaldehyd in DPBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgte die kovalente Bindung der interagierenden Proteine an die DNA. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, durch Abklopfen in 1 ml DPBS und Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm geerntet.

Die Zelllyse erfolgte in 1,5 ml kaltem Puffer A (Abschnitt 2.1.3) durch Inkubation für 10 Minuten auf Eis und anschließender Homogenisierung im Dounce-Homogenisator. Das Zellhomogenisat wurde für 15 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Die Kerne wurden in 250 µl kaltem Puffer C resuspendiert und 3 x 30 s mit Ultraschall behandelt, um die genomische DNA in Fragmente zwischen 500-1000 bp zu zerkleinern. Anschließend erfolgte die Abtrennung von Zellbruchstücken durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Immunopräzipitation der DNA-gebundenen Proteine erfolgte bei -80°C.

Für die Chromatin Immunopräzipitation wurden 100 µl Aliquots mit RIPA-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4°C mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Zugabe eines Antikörpers mitgeführt. Die Bindung der gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von je 50 µl Protein A-Agarose und anschließender Inkubation für 3 Stunden bei 4°C. Die Präzipitate wurden zweimal mit je 1 ml RIPA-Puffer und zweimal mit je 1 ml DPBS gewaschen. Die Zentrifugationsschritte erfolgten für jeweils eine Minute bei 1000 g.

Die DNA/Protein-Komplexe wurden durch zweimalige Inkubation mit je 250 µl Elutionspuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur eluiert. Durch die Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M und anschließender Inkubation bei 65°C für 4 Stunden erfolgte die Auflösung der durch Formaldehyd vermittelten DNA/Protein-Bindung. Als Positivkontrolle für die PCR wurde von einem Aliquot des Ausgangsmaterials ebenfalls, die durch Formaldehyd vermittelte DNA/Protein-Bindung aufgelöst.

Die freigesetzten Proteine wurden mit 40 µg Proteinase K in 40 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA bei 60°C für eine Stunde verdaut.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit je 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1). Die Ansätze wurden für eine Minute mit einem Vortex-Gerät gemischt und anschließend für

3 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 µg Glykogen und 500 µl Ethanol (96%) zur separierten oberen wässrigen Phase, erfolgte die DNA-Fällung bei -20°C über Nacht. Diese Ansätze wurden anschließend bei 14.000 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das entstandene Pellet 1x mit 70 %-igen Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen und je 10 µl kamen als Template in der PCR zum Einsatz.

Die PCR erfolgte mit der Advantage2 - Polymerase von Clontech entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die Primer wurden so gewählt, dass die Bindungsstelle des untersuchten Transkriptionsfaktors eingeschlossen wurde.

Tab. 2.5 Primerkombinationen für den Nachweis der *in vivo*-Bindung der Transkriptionsfaktoren EGR 1 und SREBP 1 nach erfolgter Chromatin Immunopräzipitation

Transkriptionsfaktor	Primer	Fragment
EGR1	P1 5' -CCA TGG TGG GCT ACT GGG AAC TT-3'	169 bp
	P1' 5' -TCC CGC GCC GAG GCC TAG CC -3'	
SREBP1	P2 5' -AGG CCT CGG CGC GGG AGG TC-3'	185 bp
	P2' 5' -ATG CCC GCC GGT CTG TGC GTC-3'	

Für die Amplifizierung der spezifischen PCR-Produkte wurden 35 Zyklen und eine Annealtemperatur von 67°C gewählt. Die Detektion der Produkte erfolgte in einem 1% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht.

2.2.8 Reverse Transkription

Während der Reversen Transkription (RT) wird RNA in cDNA umgeschrieben. Für die RT wurde die aus Avian Myeloblastosis Virus isolierte Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet. Als Startmoleküle der Reaktion dienten Oligo-dT-Primer. Sie binden spezifisch an die poly-A-Enden der mRNA, von wo aus die reverse Transkription gestartet wird.

Die Reaktion erfolgte in einem 45 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung: 3 µg Gesamt-RNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 30 U RNase Inhibitor, 0,166 mM dNTPs, 150 pmol Oligo dT₁₅-Primer und 15 U AMV-Reverse Transkriptase. Nach 90 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 Minuten bei 95°C gestoppt.

Die Kontrolle der RT erfolgte mit je 1 µl des Reaktionsansatzes über die PCR der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die in allen Geweben in vergleichbarer Transkriptanzahl vorkommt (Haushaltsgen).

Tab. 2.6 Primerkombinationen für den Nachweis der murinen bzw. humanen GAPDH

GAPDH		Primer	Annealing	Größe
humane	up	5' -TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA-3'	66°C	520 bp
	do	5' -ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC-3'		
murine	up	5' -TCG GTG TGA ACG GAT TTG GCC GTA-3'	69°C	520 bp
	do	5' -ATG GAC TGT GGT CAT GAG CCC TTC-3'		

Die Primerkombinationen und die Bedingungen für die PCR der untersuchten Transkripte des ph/snGPx-Gens sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Es wurden je 2-3 µl der RT-Reaktion eingesetzt.

Tab. 2.7 Murine bzw. humane ph/snGPx-spezifische Primerkombinationen

Transkript	Primer									Annealing	Größe	
murine												
mitochondriale phGPx	up	5′	−GAG	ATG	AGC	TGG	GGC	CGT	CTG	A−3′	67°C	322 bp
	do	5′	−GCC	TCC	CAA	ACT	GGT	TGC	AGG	G−3′		
snGPx	up	5′	−TCG	CCG	GAT	GGA	GCC	CAT	TCC	T−3′	67°C	527 bp
	do	5′	−ACG	CAG	CCG	TTC	TTA	TCA	ATG	AGA−3′		
humane												
snGPx	up	5′	−CCG	GCG	GAA	GAA	GCC	CTG	TCC−3′	67°C	370 bp	
	do	5′	−CGA	ATT	TGA	CGT	TGT	AGC	CCG			CG−3′

Die PCR Produkte wurden in einem 2% -igen Agagrosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach Gelextraktion (Qiagen, Hilden) der entsprechenden Bande und anschließender Klonierung in den pGEM-T-Klonierungsvektor (Promega, Mannheim) entsprechend den Anweisungen der Hersteller.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Tierexperimente

Für die Untersuchung der einzelnen ph/snGPx-Transkripte und der daraus folgenden Proteine wurden verschiedene Organe und Gewebe der Maus herangezogen. Dafür wurden männliche adulte Mäuse (C57BL/N6, 10-15 Wochen alt) mit Äther getötet und anschließend die einzelnen Organe und Gewebe entnommen. Die Lagerung bis zur entsprechenden Verarbeitung erfolgte nach intensivem Waschen in DPBS und Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

2.3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzelle (HEK293) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂, 95% Luft und Wasserdampfsättigung. Nach Erreichen der Präkonfluenz (2-3 Tage) wurden die adhärent wachsenden Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellen abgeklopft, bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in frischem Medium gut resuspendiert. Die neue Aussaat erfolgte im Verhältnis 1:5 bis 1:7. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Neubauer-Hämozytometers. Dabei wurde gleichzeitig die Vitalität durch die Zugabe einer Trypanblaulösung geprüft. Die Sicherung der HEK293 Zelllinie erfolgte durch Kryokonservierung. Dafür wurden ca. 3×10^6 Zellen in Medium mit 20% FCS und 10% DMSO in Kryoröhrchen aliquotiert, in einem Styroporbehälter langsam bei -80°C für 24 Stunden eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.3 Zellfraktionierung

2.3.3.1 Präparation zytosolischer Extrakte

Die Präparation zytosolischer Extrakte erfolgte mit Hilfe des Dounce-Homogenisators auf Eis. Das entsprechende Gewebe wurde mit einem Skalpell vorzerkleinert und in einem fünffachen des Zellvolumens an kaltem TBS-Puffer (25 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, Proteaseinhibitoren-Cocktail, pH 7,4) homogenisiert. Die Abtrennung von nichtgelösten Zellbestandteilen erfolgte durch Zentrifugation bei 20.000xg und 4°C für 15 Minuten. Der zytosolische Extrakt wurde in Aliquots von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.3.2 Präparation nukleärer Extrakte

Die Extraktion von Proteinen aus Zellkernen stellt eine grundlegende Methode für die Analyse von DNA/Protein-Interaktionen dar. Die Präparation nukleärer Extrakte von Zellen oder Geweben erfolgte mit der Dounce-Homogenisator-Methode nach Dignam *et al.*, 1983. Es wurden nukleäre Extrakte von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293), vom Maus-Testis und von der Maus-Niere gewonnen.

Die Vorbereitung der entsprechenden Materialien wurde folgendermaßen durchgeführt. Die präkonfluenten HEK293 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit DPBS abgeklopft, in ein 50 ml Falcon Tube überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet diente zur Präparation des nukleären Extrakts. Die entsprechenden murinen Gewebe wurden entnommen und intensiv mit DPBS gespült, um das Blut zu entfernen. Für die Präparation der nukleären Extrakte wurden die entsprechenden Gewebe mit einem Skalpell vorzerkleinert. Die weiteren Schritte erfolgten für die geernteten Zellen bzw. vorzerkleinerten Gewebe identisch.

Die vorbereiteten Materialien wurden in einem 5fachen des Zellvolumens an kaltem Puffer A (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,35 M Sucrose, Proteaseinhibitoren-Cocktail, pH 7,9) aufgenommen und in einem vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten auf Eis erfolgte die Homogenisierung der gequollenen Zellen (10-15 mal). Anschließend wurden die Lösungen bei 4000xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die Zellkerne.

Die Extraktion der Kernproteine erfolgte durch Resuspension der Kerne in einem zweifachen des Pelletvolumens an kaltem Puffer C (20 mM Hepes, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50% Glycerol, Proteaseinhibitoren-Cocktail, pH 7,9) und anschließender Inkubation unter ständigem Rühren bei 4°C für 45 Minuten. Das Kernlysat wurde für 15 Minuten bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Kernproteine enthielt, wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.4 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS Elektrophorese wurden die entsprechenden Proteinextrakte in 1fach Ladungspuffer (4xRoti-Load1, Roth) 10 min bei 95°C unter reduzierenden Bedingungen denaturiert. Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte in einem Acrylamidgel (4% -iges Sammelgel, 12,5% -iges Trenngel) mit 1fach Elektrophoresepuffer unter Wasserkühlung. Dabei wurde die Elektrophoreseeinheit Hoefer Mighty Small Mini-Vertical Unit (Amersham Biosciences, Freiburg) genutzt.

Die aufgetrennten Proteine wurden mit einer Coomassie-Lösung angefärbt. Für die Entfernung der Hintergrundfärbung kam eine Methanol/Essigsäure/Wasser Mischung (40/10/50, v/v/v) zum Einsatz.

Für die Protein-Dot Blot Analyse wurden ca. 10 µl der entsprechenden FPLC-Fraktion auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Membran analog der Western Blot-Membran behandelt und die ph/snGPx detektiert.

2.3.6 Zweidimensionale-Gelelektrophorese

Bei dieser Art der Gelelektrophorese wurden die Proteine in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension (SDS-Gelelektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Die Proteine wurden nach Wessel und Flügge (1984) gefällt und anschließend in der entsprechenden Menge Probenpuffer aufgenommen.

Der Probenauftrag (max. 10 µl) erfolgte in das entsprechend vorbereitete Acrylamid-Gelröhrchen gefolgt von 10 µl Übersichtungslösung und 5-10 µl Anodenpuffer. Es dienten 10 mM H₃PO₄ als Anoden-Puffer und 20 mM NaOH als Kathoden-Puffer. Die Elektrophorese wurde ohne Vorlauf für 4 Stunden bei 400 V durchgeführt.

Nach der IEF wurde das Röhrchengel auf das 4% -ige Sammelgel des SDS-Polyacrylamid-trenngels (12,5%) mit Hilfe einer Agaroselösung eingegossen. Nach Erstarren der Agarose erfolgte die SDS-Elektrophorese (s.o.).

Die Proteinspots wurden mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. Für die Entfernung der Hintergrundfärbung kam eine Methanol/Essigsäure/Wasser-Mischung (40/10/50, v/v/v) zum Einsatz. Das Molekulargewicht konnte mit Hilfe der eingesetzten Regenbogenmarker ermittelt werden.

Für die Identifizierung des immunreaktiven Spots wurde das Acrylamidgel analog der für den Western Blot beschriebenen Vorgehensweise geblottet und anschließend einer Antikörperbehandlung unterzogen.

2.3.7 Messung der phGPx-Aktivität

Bei der Bestimmung der phGPx-Aktivität handelt es sich um einen gekoppelten optischen Test, bei dem das bei der Reduktion der Peroxide durch die phGPx gebildete GSSG durch Glutathion Reduktase und NADPH reduziert wird. Aus der Abnahme der NADPH-Konzentration kann die phGPx-Aktivität bestimmt werden. Die Absorptionsabnahme von NADPH wird bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient ϵ für NADPH beträgt $6,3 \times 10^3 \text{ (mol/l)}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Unter den bekannten Glutathion-Peroxidasen ist die phGPx das einzige Enzym, das in der Lage ist Phospholipid-Hydroperoxide zu reduzieren. Deshalb wurde als Substrat Phosphatidylcholin-Hydroperoxid hergestellt. Damit kann selektiv die phGPx-Aktivität bestimmt werden.

2.3.7.1 Herstellung von Phosphatidylcholin-Hydroperoxiden (PCOOH)

Die Phosphatidylcholin-Hydroperoxide wurden in folgendem Reaktionsansatz hergestellt: 780 µg L- α -Phosphatidylcholin (Sojabohne), 1 mg Sojabohnen-Lipoxygenase (326.000 U/mg), 19 ml 0,2 M Boratpuffer und 3 mM Natriumdesoxycholat. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Lipide nach der Methode von Bligh und Dyer (1959) extrahiert.

Die organische Phase wurde mit dem Rotationsverdampfer entfernt und die Lipide in 500 µl HPLC-Laufmittel (Methanol/Acetonitril/Wasser, 90:6:4, v/v/v und 20 mM Cholinchlorid) aufgenommen. Die Trennung des PCOOH von nicht umgesetztem Substrat (PC) erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC. Die PCOOH-Fraktion wurde über Festphasenextraktion vom Cholinchlorid getrennt und anschließend in Methanol aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der PCOOH erfolgte am Photometer bei 235 nm unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von 25,000 (M cm)⁻¹. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei -80°C.

2.3.7.2 Photometrische Messung der phGPx-Aktivität

Für die Bestimmung der phGPx-Aktivität wurde die zu untersuchende Proteinpräparation (5-20 µl) im Reaktionspuffer mit folgender Zusammensetzung: 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM NADPH, 3 mM Glutathion, 1 U Glutathion Reduktase für 10 min bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml vorinkubiert bis keine Extinktionsänderung bei 340 nm mehr erfolgte.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substrates (PCOOH, Endkonzentration 5 µM) gestartet. Aus der Absorptionsabnahme von NADPH bei 340 nm erfolgte die Berechnung der phGPx-Aktivität. Die spezifische Aktivität wurde folgendermaßen definiert: 1 U/mg Protein entspricht der Reduktion von 1 µmol PCOOH in einer Minute bei einer Glutathionkonzentration von 3 mM.

2.3.8 Aufreinigung der snGPx aus der murinen Niere

Die Gewinnung des zytosolischen Extrakts der Niere erfolgte entsprechend Abschnitt 2.3.3.1. Der Extrakt wurde entsalzt (Bio-Rad Entsalzungssäulchen) und anschließend durch einen Spritzenvorsatz-Filter (0,45 µm, Millipore, USA) filtriert. Das Filtrat wurde direkt der FPLC zugeführt.

Die Aufreinigung der snGPx erfolgte durch NaCl-Gradientenelution mit einer Resource Q-Säule (Pharmacia, Freiburg). Die Flussrate war auf 1 ml/min festgesetzt. Vom Eluat (Protein-Detektion durch Messung der Absorption bei 280 nm) wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und auf Anwesenheit der snGPx durch Protein-Dot Blot Analyse (Abschnitt 2.3.5) getestet. Die immunpositiven Fraktionen wurden vereinigt und für weitere Experimente (Abschnitte 2.3.5 und 2.3.7.2) eingesetzt.

2.3.9 Immunohistochemie und Immunelektronen-Mikroskopie

Um die intrazelluläre Lokalisierung der snGPx in der Niere (Maus, Ratte) zu untersuchen, wurden Nierenschnitte mit Hilfe des monoklonalen sn/phGPx-Antikörpers (MAK ph/snGPx) untersucht. Die methodische Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. N. Savaskan, Institut für Anatomie und Zellbiologie (Charité, Humboldt Universität zu Berlin).

Stringente ABC-DAB/Ni-Immunohistochemie (Trojanowski *et al.*, 1989; Kosaka *et al.*, 1986; Straus, 1982):

Als Ausgangsmaterial dienten Gefrierschnitte (10-20 µm) der Niere (Ratte und Maus). Die Schnitte wurden in PBS gespült, 15 min bei RT in 1% Natriumborhydrid (Lsg 3) reduziert und 2 x 15 min in PBS gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit Phenylhydrazin in 10% NGS mit 0,3% Triton (10% NGS-PhT; Lsg 7) behandelt. Die Schnitte wurden dann direkt in die Erstantikörperlösung mit dem monoklonalen ph/snGPx-Antikörper (Lsg 10) überführt und für 36 Stunden im Kühlraum inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (20 min und 40 min) in PBS und Vorinkubation für 60 min in PBS-A (Lsg 5) wurden die Schnitte in die entsprechende Lösung des Zweitantikörpers mit einem biotinylierten Anti-Maus IgG Antiserum (Lsg 11) überführt und für weitere 24 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (20 min und 40 min) in PBS und Vorinkubation für 60 min in PBS-A (Lsg 5) wurden die Schnitte für 6 Stunden bei RT mit dem ABC-Komplex (Lsg 12) inkubiert. Nach dem Auswaschen des ABC-Komplexes (10, 20 und 30 min in PBS) wurden die Schnitte für 15 min in Lsg 16 vorinkubiert. Anschließend wurde die gebundene Peroxidase durch Inkubation für 3-6 min in

Lsg 18 dargestellt. Nach erneutem zweimaligen Auswaschen (10 und 20 min) in PBS wurden die Schnitte aus PBS auf Gelantine-überzogene Objektträger aufgezogen (in großer Schale 1:1 H₂O/PBS) und maximal 30 min an der Luft getrocknet. Die aufgezogenen Schnitte wurden durch die Alkoholreihe ins Xylol gebracht und danach eingedeckt.

Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind in Abschnitt 2.1.3 zusammengefasst.

Elektronen-Mikroskopie:

DAB-gefärbte Schnitte (50 µm) wurden durch Inkubation (ca. 2 min) in 1% OsO₄ und 6,85 % Saccharose (5 ml 2% OsO₄ mit 5 ml Saccharose, 0,69 g) einer Osmierung unterzogen und anschließend 3x in PBS gewaschen. Nach Entwässerung mit Alkohol erfolgte eine Schnelleinbettung in Eponmedium. Nach anschließender Anfertigung ultradünner Schnitte erfolgte die Analyse mit einem Zeiss EM 900 Elektronen-Mikroskop (Zeiss, Jena).

2.3.10 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Roti-Quant System (Promega, Karlsruhe) basierend auf der Methode nach Bradford (1976). Als Eichprotein kam BSA im Konzentrationsbereich von 1-10 µg/µl zum Einsatz.

3. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung des murinen ph/snGPx-Gens

3.1.1 Klonierung der murinen phGPx-cDNA

Die genaue Untersuchung von genomischen Sequenzen liefert vielseitige Informationen, z.B. über die Exon/Intron-Struktur von Genen und daraus abgeleitete mRNA-Transkripte, über potentielle Promotorbereiche oder über mögliche DNA/Protein-Wechselwirkungen. Daraus erhaltene Erkenntnisse ermöglichen Rückschlüsse auf die Expressionsregulation von Genen. Detaillierte genomische Sequenzinformationen stellen weiterhin die Voraussetzung für Gen-Knockout Experimente dar, die grundlegend zur Aufklärung von Genfunktionen beitragen.

Zum Zeitpunkt des Beginns unserer Untersuchungen war nur die Sequenz des phGPx-Gens vom Schwein bekannt (Brigelius-Flohé *et al.*, 1994). Da die Maus jedoch ein leichter zugängliches System für detaillierte funktionelle Untersuchungen darstellt, sollte als erstes das murine phGPx-Gen isoliert und kloniert werden. Eine geeignete Methode dafür ist das Durchsuchen von Genbanken mit Hilfe der Plaque-Lift-Hybridisierungstechnik (Abb. 3.1).

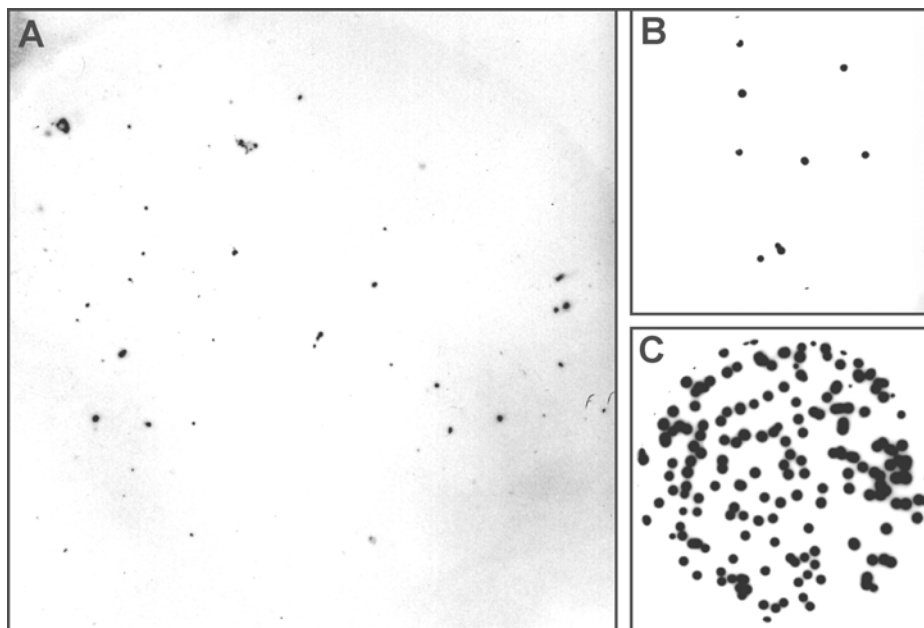


Abb. 3.1 Screen einer murinen Lambda-Phagen Fibroblasten cDNA-Bank durch Plaque-Lift-Hybridisierung mit einer DNA-Sonde aus dem kodierenden Bereich der humanen phGPx

Der Primärscreen (A) wurde auf runden Nitrozellulosefiltern (Ø 150 mm) mit ca. 30.000 pfu / Platte durchgeführt. Die positiven Plaques waren nach Hybridisierung mit der Meerrettich-Peroxidase markierten phGPx-Sonde und anschließender Detektion und Exposition auf einem Röntgenfilm als schwarze Punkte erkennbar. Sekundär- und Tertiärscreen (B+C) wurden auf runden Nitrozellulosefiltern (Ø 88 mm) durchgeführt und dienten zur Aufreinigung, der beim Primärscreen identifizierten Klone, bis zu genetischen Homogenität.

																			M	C	A	S	R	D	D	W	R	C	A	R	S	M	H	E	16
ggcgctggtctctggcaggcacc																			ATG	TGT	GCA	TCC	CGC	GAT	GAT	TGG	CGC	TGT	GCG	CGC	TCC	ATG	CAC	GAA	69
F	S	A	K	D	I	D	G	H	M	V	C	L	D	K	Y	R	G	F	V	C	37														
TTC	TCA	GCC	AAG	GAC	ATC	GAC	GGG	CAC	ATG	GTC	TGC	CTG	GAT	AAG	TAC	AGG	GGT	TTC	GTG	TGC	132														
I	V	T	N	V	A	S	Q	Sec	G	K	T	D	V	N	Y	T	Q	L	V	D	58														
ATC	GTC	ACC	AAC	GTG	GCC	TCG	CAA	TGA	GGC	AAA	ACT	GAC	GTA	AAC	TAC	ACT	CAG	CTA	GTC	GAT	195														
L	H	A	R	Y	A	E	C	G	L	R	I	L	A	F	P	C	N	Q	F	G	79														
CTG	CAT	GCC	CGA	TAT	GCT	GAG	TGT	GGT	TTA	CGA	ATC	CTG	GCC	TTC	CCC	TGC	AAC	CAG	TTT	GGG	258														
R	Q	E	P	G	S	N	Q	E	I	K	E	F	A	A	G	Y	N	V	K	F	100														
AGG	CAG	GAG	CCA	GGA	AGT	AAT	CAA	GAA	ATC	AAG	GAG	TTT	GCA	GCC	GGC	TAC	AAC	GTC	AAG	TTT	321														
D	M	Y	S	K	I	C	V	N	G	D	D	A	H	P	L	W	K	W	M	K	121														
GAC	ATG	TAC	AGC	AAG	ATC	TGT	GTA	AAT	GGG	GAC	GAT	GCC	CAC	CCA	CTG	TGG	AAA	TGG	ATG	AAA	384														
V	Q	P	K	G	R	G	M	L	G	N	A	I	K	W	N	F	T	K	F	L	142														
GTC	CAG	CCC	AAG	GGC	AGG	GGC	ATG	CTG	GGA	AAT	GCC	ATC	AAA	TGG	AAC	TTT	ACC	AAG	TTT	CTC	447														
I	D	K	N	G	C	V	V	K	R	Y	G	P	M	E	E	P	Q	V	I	E	163														
ATT	GAT	AAG	AAC	GGC	TGC	GTG	GTG	AAG	CGC	TAT	GGT	CCC	ATG	GAG	GAG	CCC	CAG	GTG	ATA	GAG	510														
K	D	L	P	C	Y	L	*													171															
AAG	GAC	CTG	CCG	TGC	TAT	CTC	TAG	ctagccctacaaagtgtgtgcccctacaccgagccccctgccctgtgaccc												585															
ctggagccttccaccccggcactcatgaaggctgcctgaaaaccagcctgctggtggggcagtcctgaggacctggcggtgca																					668														
tccctgccggaggaaggtccagaggcctgtggccctgggctcgagcttcaccctggctgccttgtgggaataaaatgtagaaa																					751														
tgcaaaaaaaaaaaaaaaaaa																					770														

Sec	kennzeichnet die Position des Selenocysteins
—	potentielles Polyadenylierungssignal
TAG	Stopp-Kodon
ATG	potentieller Translationsstart für die zytosolische Form der phGPx
Großbuchstaben	translatierte Region
Kleinbuchstaben	untranslatierte Region

Die Subklonierung der cDNA aus dem Lambda-Phagen in einen Plasmidvektor (pBluescript II SK) und anschließende Sequenzierung führten zu einer phGPx-cDNA von 770 bp mit einer 5'-untranslatierten Region von 23 bp und einer 3'-untranslatierten Region von 236 bp.

In der kodierenden Region wurde ein TGA-Kodon identifiziert, welches für das Selenocystein steht. Das isolierte phGPx-Transkript besitzt ein potentiell Startkodons. Der Vergleich mit bereits isolierten Transkripten aus Mensch, Ratte, Schwein (Esworthy *et al.*, 1994; Pushpa-Rekha *et al.*, 1995; Brigelius-Flohé *et al.*, 1994) zeigte, dass es sich dabei um die kürzere (zytosolische) Form handelte. Zeitgleich zu unseren Untersuchungen erfolgte die Isolierung der längeren Form der phGPx aus murinen Hoden (Nam *et al.*, 1997).

Das längere phGPx-Transkript wird als mitochondriale Form bezeichnet (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995) und besitzt 78 bp vor dem Startkodons für die zytosolische Form ein zusätzliches Startkodons im gleichen Leseraster. Die Transkription von diesem Startkodons führt zu einem Protein mit einem zusätzlichen mitochondrialen Insertionspeptid, das den Transport des entsprechenden Proteins in die Mitochondrien ermöglicht. Die weiteren Sequenzen beider phGPx-Transkripte sind identisch. Die mitochondriale Form der phGPx konnte in der Maus-Fibroblasten cDNA-Bank nicht nachgewiesen werden.

3.1.2 Klonierung des murinen ph/snGPx-Gens

Für die Suche nach dem murinen Gen der phGPx wurde eine genomische Phagenbank der Maus-Leber mit der Plaque-Lift-Hybridisierungstechnik durchsucht. Als Sonde dienten ein Spaltfragment aus der kodierenden Region und ein Spaltfragment aus der 3'-untranslatierten Region der subklonierten murinen phGPx-cDNA aus der Fibroblasten-Bank (Abschnitt 2.2.2.2). Nach der ersten Hybridisierungsrunde waren 8 von 210.000 getesteten Plaques phGPx positiv.

Die anschließende PCR-Analyse der 8 isolierten Plaques mit phGPx-spezifischen Primern zeigte, dass 4 Plaques ein phGPx-spezifisches PCR-Signal ergaben (Abb.3.3).

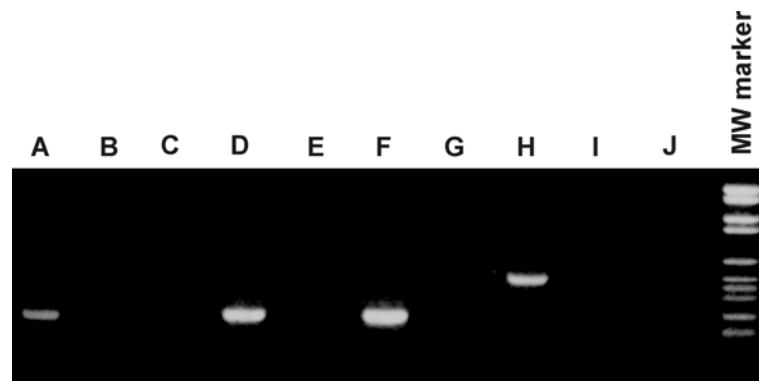


Abb. 3.3 PCR-Analyse phGPx-positiver genomischer Rekombinanten

Die Phagenplaques (A-J) wurden in 100 µl Lambdapuffer resuspendiert, scharf anzentrifugiert und 5 µl für die PCR mit Maus phGPx-spezifischen Primern eingesetzt (G+H, Abschnitt 2.2.2.2). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in einem 2% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid. Die Position der Primerkombination schließt den Bereich zwischen Exon 2 und Exon 4 ein. Bei vergleichbarer Genstruktur von Schwein und Maus sollte das entstehende PCR-Fragment für das murine phGPx-Gen ca. 500 bp umfassen. Nur die Bahn H zeigte die erwartete Größe. Die entstandenen PCR-Fragmente der Proben A, D und F entsprechen jeweils nur der Summe der eingeschlossenen Exons ohne intronische Sequenzen (290 bp). Die Sequenzierung der PCR-Fragmente bestätigte diese Aussagen.

Unter der Voraussetzung, dass die Exon/Intron-Struktur des bekannten phGPx-Gens vom Schwein vergleichbar mit der des phGPx-Gens der Maus ist, wurden die Primer in das Exon 2 und 4 gelegt. Die zu erwartende Größe des PCR-Produkts beim phGPx-Gen betrug ca. 500 bp. Nur bei einem Plaque (H) stimmte die Größe. Die Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigte genomische Maus-spezifische phGPx-Sequenzen in dem Bereich Exon 2, Intron 2, Exon 3, Intron 3 und Exon 4. Die Größe der PCR-Signale von den Plaques A, D und F waren deutlich kleiner (ca. 300 bp) und die anschließende Sequenzierung zeigte, dass es sich um den Bereich Exon 2 bis Exon 4 ohne intronische Sequenzen handelte. Dabei zeigte sich, dass die Klone A und D identisch waren. Es konnte festgestellt werden, dass in der untersuchten genomischen Mausbank Pseudogene enthalten sind, denen mindestens zwei Introns fehlen. Die isolierten Plaques B, C, E, und G waren phGPx negativ.

Klon H wurde analog Kapitel 3.1.1 bis zur genetischen Homogenität gereinigt, die DNA isoliert und sequenziert. Das genomische Fragment von ca. 20.000 bp enthielt das murine phGPx-Gen mit einer Länge von 3952 bp einschließlich 1000 bp der 5'-flankierenden Region (potentielle Promotorregion).

Das murine phGPx-Gen ist in 8 Exons und 7 Introns (Abb. 3.4 A) unterteilt und besitzt eine große Ähnlichkeit zu den Analogen des Menschen und des Schweins (Kelner & Montoya, 1998; Brigelius-Flohé *et al.*, 1994). Die alternative Nutzung von Exon 1a oder Exon 1b führt zu unterschiedlichen Transkripten, die sich in der Anfangsregion unterscheiden.


```

1760 tagtttgggtcagaactcagagatctgcctgcctgctaaagtgtgggattaaaggtgtgcaccactggctggctcaaa
1840 gatgacttttagttgtattttatgtgtatgggtgttttgtctgagtgtatttatgtgtaccacgtggtacaggtcgagag
1920 actagaagagggcatggaatttgccaaagctggggttggtgggttggttagccaccaagtgggctggggtgatttgagt
2000 gctctttaaggacagccagtgtcttcacagtctttggcctgtctgcccctaccacgccaattatcttcttttggtatgctg
2080 tttgtgtgcatgcaagtctgtgtcatgcatgcatgcatgcttgaagccctccaagccggaagacacctgtggtcctggga
2160 attggagtttaacagactttcgggtgctgggagtgtagccattccccagaagacagtgcatccctaaccacaagggagct
2240 acagcttcagtttccctggctggcctggaacagactatgtccaaccaggtggcttagaacttcatacccttgctgttt
2320 tctaaatgctgggattaaagtgtgtaccaccatgccctggcagggtaccactgttaaaccattctttttctccttcccc
      N' A I K W N F T K
2424 ctccccctcccag T GCC ATC AAA TGG AAC TTT ACC AAG gtaagtggcatacagtgtgggaatgtgtcccag
      F L I D K
2494 ctccccctccctcctccacgctgggtgtcctcaactgtcaacacatgttctctgtctttacag TTT CTC ATT GAT AAG
      N G C V V K R Y G P M E E P Q
2568 AAC GGC TGC GTG GTG AAG CGC TAT GGT CCC ATG GAG GAG CCC CAG gtaattattacctttgccaa
      V I E
2633 agcagcccgagccagggtgtgtgctgaggtgtgtgaggggcacgtgtgaacgagttatctccctacag GTG ATA GAG
      K D L P C Y L *
2708 AAG GAC CTG CCG TGC TAT CTC TAG CTAGCCCTACAAGTGTGTGCCCTACACCGAGCCCCCTGCCCTGTGA
2780 CCCCTGGAGCCTTCCACCCCGGCACTCATGAAGGTCTGCCTGAAACCAGCCTGCTGGTGGGGCAGTCTGAGGACCTGG
2860 CGTGCATCCCTGCCGAGGAAGGTCCAGAGGCCTGTGGCCCTGGGCTCGAGCTTCACCTGGCTGCCTTGTGGGAATAAA
2940 ATGTAGAAATG
  
```

Abb. 3.4 Grundlegende Genstruktur der murinen ph/snGPx

Schematische Darstellung der Exon/Intron-Struktur (A) und Darstellung der Sequenz (B) mit wesentlichen Merkmalen

Die Sequenz des ph/snGPx-Gens ist in der EMBL Datenbank unter AJ012104 eingetragen.

-1 bis -1000 5'-flankierende Region (potentieller Promoterbereich)

1 bis 2950 ph/snGPx-Gen mit Exon- (Großbuchstaben) und Intron-Struktur (Kleinbuchstaben)

ATG Start-Kodon

Sec Selenocystein

TAG Stopp-Kodon

— potentiell Polyadenylierungssignal

Die Exon/Intron-Übergänge des murinen ph/snGPx-Gens entsprechen der allgemeinen Konsensussequenz für viele Gene (Alberts *et al.*, 1995) (Tab. 3.1). In allen Fällen beginnen die Introns mit „gt“ und enden mit „ag“. Diese Positionen sind für den Erkennungsmechanismus der Spleißosomen ausschlaggebend.

Tab. 3.1 Darstellung der Exon/Intron Spleiß-Übergänge des murinen ph/snGPx-Gens

In der ersten Zeile sind die allgemeinen Konsensussequenzen der Exon/Intron-Übergänge von vielen Genen dargestellt. Die für den Erkennungsmechanismus der Spleißosomen wichtigen Sequenzen „gt“-Intronanfang und „ag“-Intronende sind bei allen Introns des ph/snGPx-Gens vorhanden. Das genaue Ende des Introns 1a und der genaue Anfang des Exons 1b sind z.Z. nicht genau bekannt (n.b.). „ag“ Spleiß-Akzeptor; „gt“ Spleiß-Donor

Intron-Ende	Exon-Anfang	Exon	(Größe)	Exon-Ende	Intron-Anfang
yag	NNN	Konsensus		NAG	gtra
	CAGGGG	Exon 1a	(228 bp)	ACCATG	<u>gt</u> gggcta
n.b.	n.b.	Exon 1b	(252 bp)	GGCTTG	<u>gt</u> gtgcgg
ttttac <u>ag</u>	TGTGCA	Exon 2	(95 bp)	GTACAG	<u>gt</u> gggttt
tctccc <u>ag</u>	GGGTTT	Exon 3	(145 bp)	AGGCAG	<u>gt</u> gtgtgg
tcctgc <u>ag</u>	GAGCCA	Exon 4	(152 bp)	GGGAAA	<u>gt</u> gagtgg
cctccc <u>ag</u>	TGCCAT	Exon 5	(25 bp)	ACCAAG	<u>gt</u> aagtgg
tcttac <u>ag</u>	TTTCTC	Exon 6	(60 bp)	CCCCAG	<u>gt</u> aattat
ccctac <u>ag</u>	GTGATA	Exon 7	(242 bp)	AATAAA	

Alle anderen zur Konsensussequenz gehörenden Basen sind mehr oder weniger stark konserviert. Ein Vergleich der Genstruktur zwischen Mensch, Schwein und Maus ergab identische Spleißstellen und vergleichbare Exongrößen mit Ausnahme der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen.

3.1.3 Identifizierung muriner phGPx-Pseudogene

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, führte die Suche nach dem murinen phGPx-Gen zu zwei weiteren unterschiedlichen genomischen Rekombinanten, die phGPx-spezifische Sequenzen beinhalteten. Dabei handelte es sich um genomische phGPx-Sequenzen denen mindestens zwei Introns fehlten. Die weitere Untersuchung mit Exon-spezifischen phGPx-Primern ergab, dass neben Intron 2 und 3 auch das Intron 6 fehlte (Abb. 3.5).

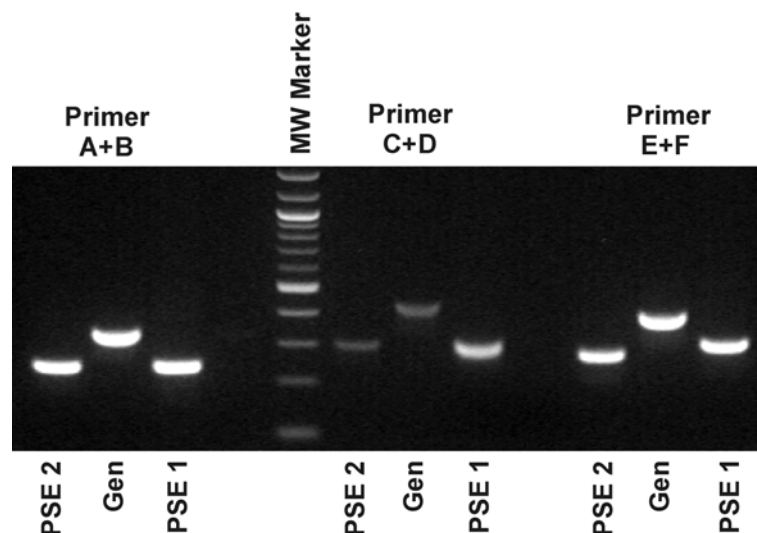


Abb. 3.5 PCR-Analyse phGPx-positiver genomischer Rekombinanten

Durch die PCR-Analyse mit verschiedenen Exon-spezifischen Primern (A-F, Abschnitt 2.2.2.2) wurden zwei unterschiedliche genomische phGPx-Rekombinanten identifiziert. Es konnte das Fehlen von Intron 2 (A+B), Intron 3 (C+D) und Intron 6 (E+F) nachgewiesen werden. Des weiteren zeigte ein Größenvergleich der PCR-Produkte von Primerkombination E+F das zusätzliche Fehlen von Exonsequenzen im Pseudogen 2. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt diese Aussagen. PSE steht für Pseudogen.

Ein Größenvergleich der PCR-Produkte mit der Primerkombination E+F zeigte, dass die Rekombinate 2 (PSE 2) zusätzliche Deletionen in den exonischen Sequenzen aufweist.

Beide Rekombinanten wurden bis zur genetischen Homogenität gereinigt und sequenziert. Die Sequenzen zeigten einen hohen Grad an Homologie zur mRNA des funktionellen phGPx-Gens. Sie enthalten keine Introns, besitzen eine A-reiche Sequenz an ihren 3'-Enden und sind von kurzen direkten Wiederholungssequenzen flankiert (Tab. 3.2). Diese Merkmale sind für prozessierte Pseudogene charakteristisch.

Tab. 3.2 Wiederholungssequenzen in den flankierenden Regionen der phGPx-Pseudogene

Pseudogen	5'-flankierende Region	3'-flankierende Region
PSE 1	gtttgtttgtttgtttattttatttttaaattgtacttta aaaattatccttcattGAAAGATACACAA	GAAAGATCACAAaatgacattgtgaaacttggaatt atttaaaaaatctttaaaaaattttttaccctttattttcttt
PSE 2	aatatgcctgtctctgaaatttcatttctaaaAAA GAAAGA	AAAGAAAGaagaagagagagagagagagagaga gagaga

Ein Vergleich mit der murinen phGPx-cDNA vom Hoden (Nam *et al.*, 1997) zeigte, dass beide Pseudogene nur das 3'-ATG besitzen, also durch Retrotransposition des kurzen Transkripts entstanden sein müssen (Abb. 3.6). Das kurze Transkript kodiert die zytosolische (nicht-mitochondriale) Form der phGPx.

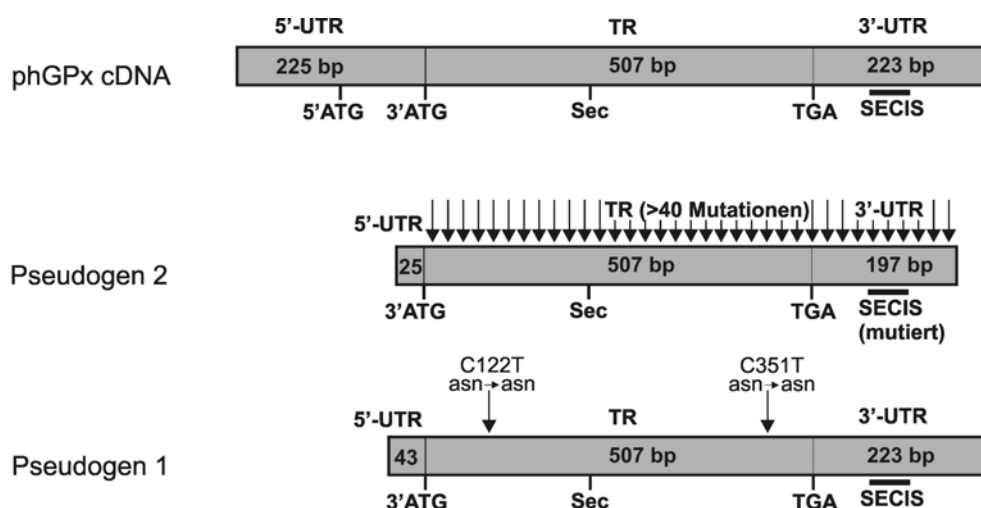


Abb. 3.6 Struktur der identifizierten phGPx-Pseudogene

Das lange Transkript der phGPx enthält zwei Startkodons. Der Translationsstart vom 5'-ATG führt zur mitochondrialen Form der phGPx und vom 3'-ATG zur zytosolischen Form. Beide Pseudogene (1+2) enthalten nur das 3'-ATG. Das katalytisch aktive Zentrum der phGPx enthält ein Selenocystein (Sec), das auch in beiden Pseudogenen enthalten ist. Der Sequenzvergleich des Pseudogens 1 mit der phGPx-cDNA zeigte nur zwei stumme Punktmutationen. Die Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) in der 3'-untranslatierten Region des Pseudogens 1 ist frei von Mutationen. Im Gegensatz dazu weist das Pseudogen 2 zahlreiche Mutationen und Deletionen auf. Die vollständigen Sequenzen der phGPx-Pseudogene sind in der EMBL-Datenbank unter den Nummern AJ291744 und AJ291745 eingetragen.

Das Pseudogen 2 weist zwar die grundlegende Struktur des kurzen phGPx-Transkripts auf, ist jedoch von über 40 Mutationen (Basenaustausche, Deletionen, Insertionen) durchzogen. Dagegen stellt das Pseudogen 1 eine fast 100% -ige Kopie des kurzen phGPx-Transkripts dar. Verglichen mit der nativen phGPx-cDNA existieren nur zwei Punktmutationen, die jedoch keine Veränderung in der Aminosäurezusammensetzung zur Folge haben. Die Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) im 3'-UTR, die essentiell für die Translation des TGA-Kodons als Selenocystein ist, weist im Gegensatz zum Pseudogen 2 keine Mutationen auf.

Die meisten prozessierten Pseudogene weisen zahlreiche Mutationen auf. Diese Tatsache wird häufig mit einem fehlenden Selektionsdruck erklärt, welcher auf eine funktionelle Irrelevanz des Pseudogens zurückzuführen ist. Treten in den Pseudogenen nur geringfügige Mutationen auf, wird deren Entstehung oft als punktuell evolutionär junges Ereignis interpretiert.

Um dem nachzugehen, wurde genomische DNA verschiedener Mausstämmen durch PCR mit Pseudogen 1-spezifischen Primern getestet. In verschiedenen Maus-Stämmen der *Mus musculus* Gruppe konnte das Pseudogen 1 nachgewiesen werden, z.B. in C57BL/N6, BALB/c (Inzucht-Stämme) und NMRI (Auszucht-Stamm). Des weiteren wurde genomische DNA von zwei verschiedenen Mausarten untersucht, deren divergente Entwicklung zu separaten Mausarten vor ca. 3 Millionen Jahren begann (Siver, 1995). In beiden untersuchten Mausarten (*Mus musculus* und *Mus spretus*) konnte die Existenz des Pseudogens 1 nachgewiesen werden (Abb. 3.7).

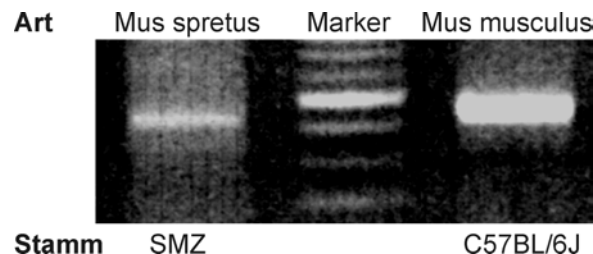


Abb. 3.7 Nachweis des Pseudogens 1 in verschiedenen Mausarten

Die PCR wurde an genomischer DNA unterschiedlicher Mausarten (*Mus musculus*, *Mus spretus*) durchgeführt. Dafür kamen Pseudogen 1-spezifische Primer (up 5'-TGTAGCCCTGGCTGTCCTGGAAT-3', down 5'-TGGTGCCTGCCAGACCAGGCG-3') zum Einsatz. Genomische DNA (0,5 µg) wurde für 5 Minuten bei 99°C vordenaturiert. Die PCR erfolgte anschließend nach dem Standardprogramm (Abschnitt 2.2) bei einer Annealingtemperatur von 67°C mit 35 Zyklen. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 2% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

- a) Die Sequenz des Pseudogens 1 weist keine funktionelle Mutationen auf.
- b) Das Pseudogen 1 ist in den Mausarten *Mus musculus* und *Mus spretus* nachweisbar, die sich in ihrer Entwicklung zu separaten Arten schon vor ca. 3 Millionen Jahren trennten.

Diese Tatsachen legen einen Selektionsdruck für das Pseudogen 1 nahe und damit eine mögliche Funktion als exprimiertes Gen. Da aufgrund der 100% -igen Aminosäurehomologie eine Unterscheidung auf Protein-Ebene nicht möglich ist, erfolgte der Expressionsnachweis des Pseudogens 1 auf mRNA-Ebene.

Durch eine der Punktmutationen im Pseudogen 1 fällt ein Restriktionsort (*Mae* II) weg, der in der phGPx-cDNA vorhanden ist (Abb. 3.8).

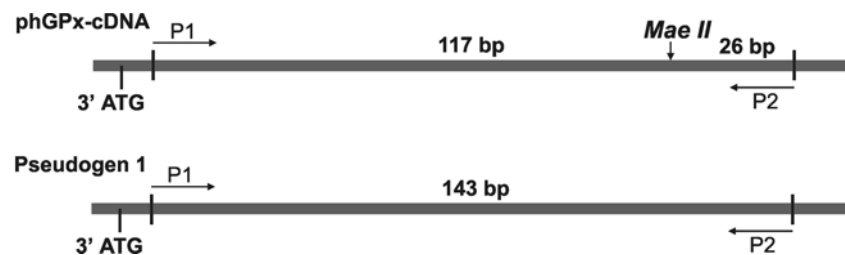


Abb. 3.8 Kombinierte PCR/Restriktionsstrategie für den Expressionsnachweis des Pseudogens 1

Das in der PCR mit phGPx-spezifischen Primern (P1: 5'-GTGCATCCCGCAATGATTGGCG-3' und P2: 5'-CAGTTTGCCTCATTCGCGAGGCC-3') amplifizierte PCR-Produkt enthält für Transkripte der phGPx einen *Mae* II-Restriktionsort. Bei einer Spaltung der gereinigten PCR-Fragmente mit *Mae* II entstehen zwei Teilfragmente von 117 bp und 26 bp. Für Transkripte des Pseudogens 1 existiert kein *Mae* II-Restriktionsort, so dass bei einer Spaltung mit *Mae* II keine Fragmente entstehen. Das PCR-Produkt von 143 bp bleibt unverändert.

Über die Isolierung der Gesamt-RNA, anschließender reverser Transkription der mRNA und PCR mit phGPx-spezifischen Primern (P1/P2, Abb. 3.8) erfolgte die Amplifizierung von phGPx-Transkripten aus verschiedenen murinen Geweben. Ein anschließender Restriktionsverdau der entstandenen PCR-Produkte mit *Mae* II führte für Transkripte des Pseudogens 1 nicht zur Spaltung. Dagegen wurden die PCR-Produkte mit phGPx-Ursprung in zwei Fragmente gespalten. Als Kontrollen dienten die klonierte phGPx-cDNA aus der Maus-Fibroblastenbank und das klonierte Pseudogen 1 aus der genomischen Maus-Bank, die der selben Strategie von PCR und Restriktion unterworfen wurden. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze bestätigte die Expression des Pseudogens 1 in fast allen getesteten Geweben (Abb. 3.9). Im murinen Hoden und in der Haut konnte keine Expression des Pseudogens 1 nachgewiesen werden.

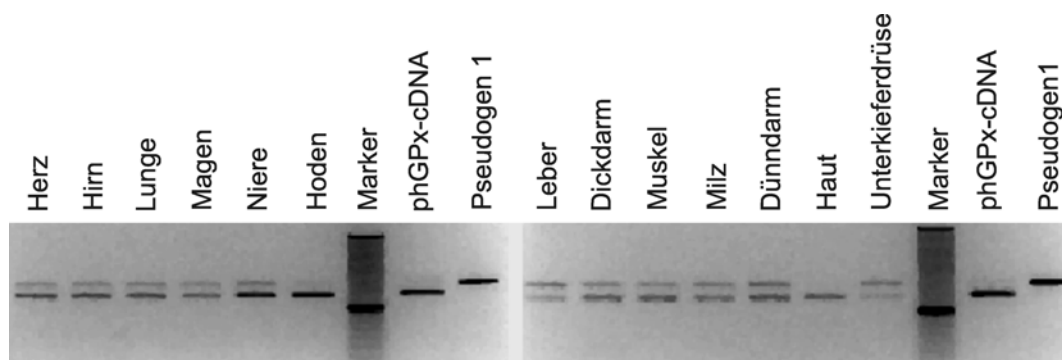


Abb. 3.9 Gewebespezifische Expression des phGPx-Pseudogens 1 (Boschan *et al.*, 2002)

Von verschiedenen murinen Geweben wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription der mRNA erfolgte die PCR mit phGPx-spezifischen Primern (P1/P2, Abb. 3.8). Das PCR-Produkt (143 bp) wurde gereinigt und anschließend je 300 ng für einen Restriktionsverdau mit *Mae* II eingesetzt. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 4% -igen Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurden die phGPx-cDNA und das Pseudogen 1 der selben PCR/Restriktionsstrategie unterworfen.

3.2 Chromosomale Lokalisierung der isolierten genomischen phGPx-Sequenzen

3.2.1 Chromosomale Lokalisierung der identifizierten Pseudogene

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur chromosomalen Lokalisierung ist die *in situ*-Hybridisierung (IHS). Hierbei werden spezifische DNA-Sequenzen des Gens genutzt, die in der Lage sind an komplementären DNA-Sequenzen auf dem entsprechenden Chromosom zu binden. Eine Unterscheidung der einzelnen Chromosomen ist nur in der Metaphase möglich, da nur dann die Chromosomen in kompakter (kondensierter Form) vorliegen. Zur Detektion der Sonden werden diese markiert. Hierfür kommen in der Regel Fluoreszenzmarker (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, FISH) zum Einsatz.

Um für die chromosomale Lokalisierung ausreichend große Sonden einsetzen zu können, war die Subklonierung der Pseudogene mit weiten Bereichen der angrenzenden 5'- und 3'-flankierenden Regionen erforderlich. Als Sonde für das Pseudogen 1 diente ein BamH I/Xho I-Fragment der isolierten genomischen Phagen-DNA. Dieses Fragment von ca. 3,6 kb wurde in einen Plasmidvektor subkloniert und beinhaltete zum größten Teil die 5'-flankierende Region des Pseudogens 1. Für das Pseudogen 2 erfolgte die Subklonierung eines BamH I-Fragments der genomischen Phagen-DNA von ca. 3,9 kb mit einem weiten Bereich der 3'-flankierenden Region.

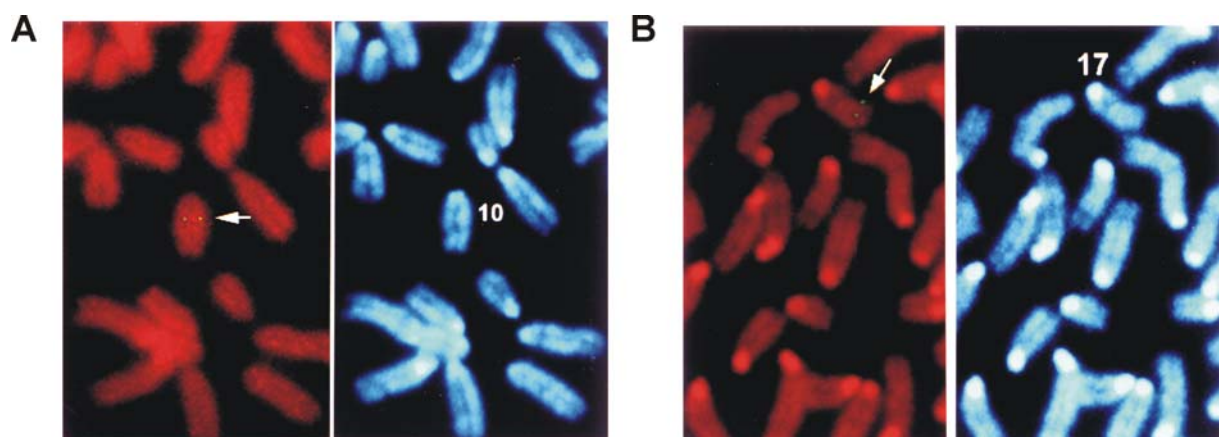


Abb. 3.10 Chromosomale Lokalisierung der phGPx-Pseudogene

Die chromosomale Lokalisierung der identifizierten Pseudogene wurde mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Bei der Analyse der Chromosomenpräparate unter einem Fluoreszenz-Mikroskop war die gebundene Biotin-markierte Sonde als Fluoreszenzsignal sichtbar (Abschnitt 2.2.3). Die hellen Punkte (Pfeile) stellen die positiven Fluoreszenzsignale dar. Das Pseudogen 1 (A) konnte auf dem murinen Chromosom 10 und das Pseudogen 2 (B) auf dem murinen Chromosom 17 lokalisiert werden.

Mit der Sonde für das Pseudogen 1 zeigten von 100 untersuchten Proben 63 positive Hybridisierungssignale. Mit Hilfe der spezifischen DAPI-Bänderungsmuster der einzelnen Chromosomen konnten diese Signale auf dem murinen Chromosom 10 identifiziert werden (Abb. 3.10 A). Für das Pseudogen 2 konnte mit einer Detektionseffizienz von 51% das murine Chromosom 17 identifiziert werden (Abb. 3.10 B).

Die detaillierte Position der entsprechenden Pseudogene wurde aus dem Vergleich von 10 positiven Bildern gewonnen. Das Pseudogen 1 wurde in der Region B2-B3 des Chromosoms 10 lokalisiert (Abb. 3.11 A). Auf der physikalischen Karte des Chromosoms 10 entspricht diese Region einem Chromosomenabschnitt, der 20-30 cM vom Centromer entfernt liegt.

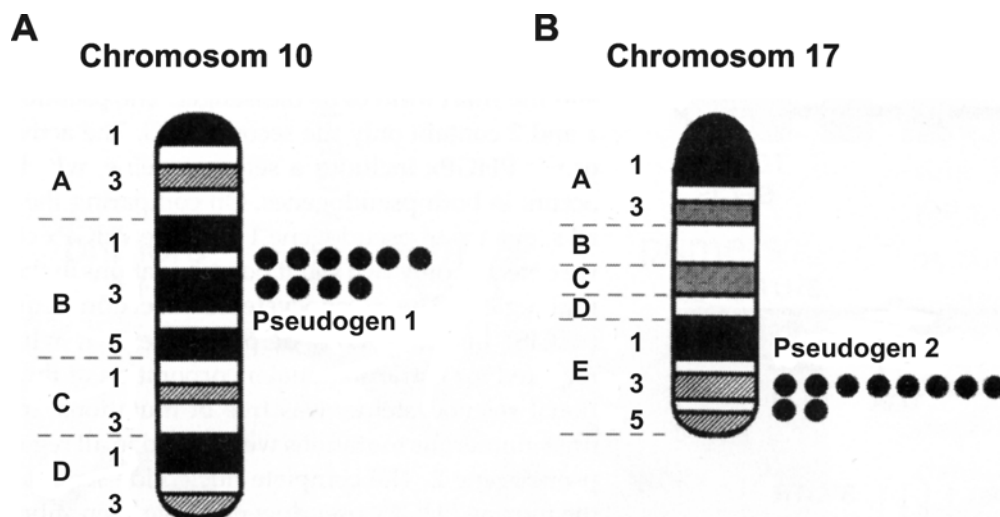


Abb. 3.11 Lokalisierung der phGPx-Pseudogene auf den entsprechenden Chromosomen

Für die identifizierten Chromosomen 10 (A) und 17 (B) ist das spezifische Bänderungsmuster dargestellt. Die schwarzen Punkte stellen die Lokalisierung der jeweiligen Fluoreszenzsignale von 10 ausgewerteten Bildern dar. Pseudogen 1 ist in der Region B2-B3 des Chromosoms 10 und Pseudogen 2 in der Region E3-E4 des Chromosoms 17 lokalisiert.

Das murine ph/snGPx-Gen wurde ebenfalls in der zentralen Region des Chromosoms 10 identifiziert und liegt etwa 40 cM vom Centromer entfernt (Knopp *et al.*, 1999).

Das Pseudogen 2 wurde in der Region E3-E4 des Chromosoms 17 lokalisiert (Abb. 3.11).

3.2.2 Chromosomale Kolokalisierung des ph/snGPx-Gens und des Pseudogens 1

Das Pseudogen 1 wurde auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Da auch das ph/snGPx-Gen auf diesem Chromosom zu finden ist, sollte die Lage zueinander bestimmt werden. Auch hierbei kam die FISH-Technik zum Einsatz, wobei die gleichzeitige Detektion der jeweiligen Gene durch unterschiedliche Sondenmarkierung erfolgte (Biotin oder Digoxigenin).

Für das Pseudogen 1 kam die gleiche Biotin-markierte Sonde wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben zum Einsatz. Als Sonde für das ph/snGPx-Gen diente ein subkloniertes BamHI-Fragment von ca. 6 kb. Dieses Fragment beinhaltete überwiegend die 3'-flankierende Region des Gens und wurde mit Digoxigenin markiert. Unter 100 untersuchten Proben zeigten 40-50 dual positive Hybridisierungssignale.

Die unterschiedlich markierten Sonden ermöglichten die selektive Detektion beider Gene auf dem Chromosom 10 (grün: Pseudogen 1, rot: ph/snGPx Gen; Abb. 3.12 A).

Die detaillierte Position des jeweiligen Gens wurde durch den Vergleich von 10 verschiedenen positiven Bildern bestimmt (Abb. 3.12 B).

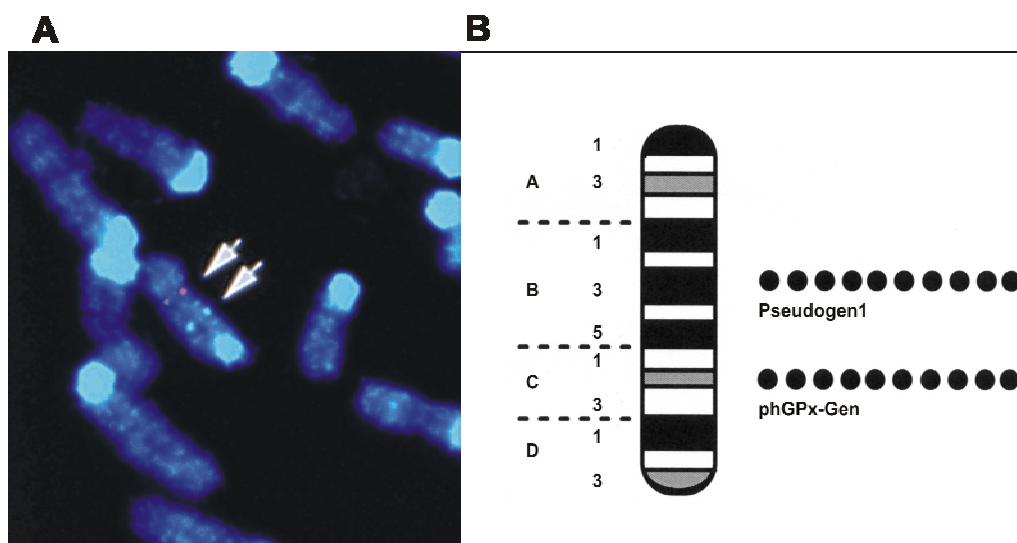


Abb. 3.12 Chromosomale Kolo-kalisierung des ph/snGPx-Gens und des phGPx-Pseudogens 1

A) Zweifarben-*in situ*-Hybridisierung am Chromosom 10. Die Sonde für das Pseudogen 1 wurde mit Biotin (grüne Punkte) und die Sonde für das ph/snGPx-Gen wurde mit Digoxigenin (rote Punkte) markiert.

B) DAPI-Bänderungsmuster des Chromosoms 10. Beide Sonden hybridisierten am selben Chromosom, jedoch in unterschiedlichen Abschnitten. Pseudogen 1 wurde in der Region B3 und das ph/snGPx-Gen in der Region C2 lokalisiert. Die schwarzen Punkte stellen die Lokalisierung der jeweiligen Fluoreszenzsignale von 10 ausgewerteten Bilder dar.

Das Pseudogen 1 befindet sich, wie schon im Abschnitt 3.2.1 beschrieben in der Region B3 (20-30 cM vom Centromer) und das ph/snGPx-Gen in der Region C2 (40 cM vom Centromer) des Chromosoms 10. Das Centromer befindet sich bei allen Maus-Chromosomen sehr nahe am Chromosomenende (Abb. 3.12 B, oberes Ende der Region A).

3.3 Funktionelle Promotorstudien am ph/snGPx-Gen

3.3.1 Untersuchung der potentiellen Promotorregion für die Bildung der phGPx-Transkripte

Die Expression eukaryotischer Gene ist ein komplexer Prozess, der auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann. Viele der heute bekannten Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert. Kurze Sequenzelemente, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden, liegen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Diese cis-regulatorischen Regionen verteilen sich für gewöhnlich auf eine über 1000 bp lange Region.

Das ph/snGPx-Gen kodiert derzeit für drei bekannte Transkripte, die sich durch eine alternative Nutzung von Exon 1a und Exon 1b definieren lassen (Pfeifer *et al.*, 2001). Für die Bildung der zytosolischen und mitochondrialen Form der phGPx wird das Exon 1a genutzt.

Mit der Klonierung des murinen ph/snGPx-Gens lagen nun die genauen Sequenzdaten vor, um die spezifische Aktivität der potentiellen Promotorregion für die Transkription der zytosolischen bzw. mitochondrialen Form zu untersuchen. Hierfür wurden unterschiedliche Abschnitte der zu untersuchenden Region in einen Reportergenvektor kloniert. Als heterologes Gen diente die leicht nachweisbare bakterielle β -Galaktosidase, die unter der Kontrolle der jeweiligen Promotorabschnitte des ph/snGPx-Gens gesetzt wurde (2.2.4).

Die Untersuchung der entsprechenden Sequenzabschnitte mit dem Programm „MatInspector“ führte zur Identifizierung potentieller Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie z.B.: NF-Y, SP1, CREB oder MZF1.

Die spezifische Aktivität der Reportergenkonstrukte wurde in HEK293 Zellen untersucht, da in diesen Zellen die phGPx-Expression nachgewiesen werden konnte. Die für die basale Expression der phGPx notwendigen Transkriptionsfaktoren sind somit in diesen Zellen vorhanden.

Es wurden drei Gruppen von Reportergen hergestellt (A, B, C), die sich durch verschiedene 3'-Enden der Inserts hervorheben (Abb. 3.13 a). Ausschlaggebend hierfür war die Existenz zweier Transkripte, die sich in ihrer Größe unterscheiden (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995). Das lange Transkript beinhaltet das 5'- und 3'-ATG und kodiert für die mitochondriale Form der phGPx. Das 5'-ATG wird bei diesem Transkript als Translationsstart genutzt. Das kurze Transkript dagegen enthält nur das 3'-ATG und deren Translation führt zur zytosolischen (nicht-mitochondrialen) Form der phGPx.

Von einem Gen werden somit zwei phGPx-Formen exprimiert und es steht die Frage nach regulatorischen Mechanismen der Transkription.

Werden beide Transkripte (langes und kurzes) separat transkribiert oder entsteht das kurze und lange Transkript durch alternative post-transkriptionelle Prozessierung einer gemeinsamen prä-mRNA? Erfolgt eine räumlich separate Transkriptionsinitiation, sollten die 5'-UTRs beider Transkripte potentiell regulatorische Sequenzen enthalten, die eine Unterscheidung auf Transkriptionsebene ermöglichen. So könnte die Region zwischen 5'- und 3'-ATG für die zytosolische Form der phGPx mit zur Transkriptionsregulation beitragen.

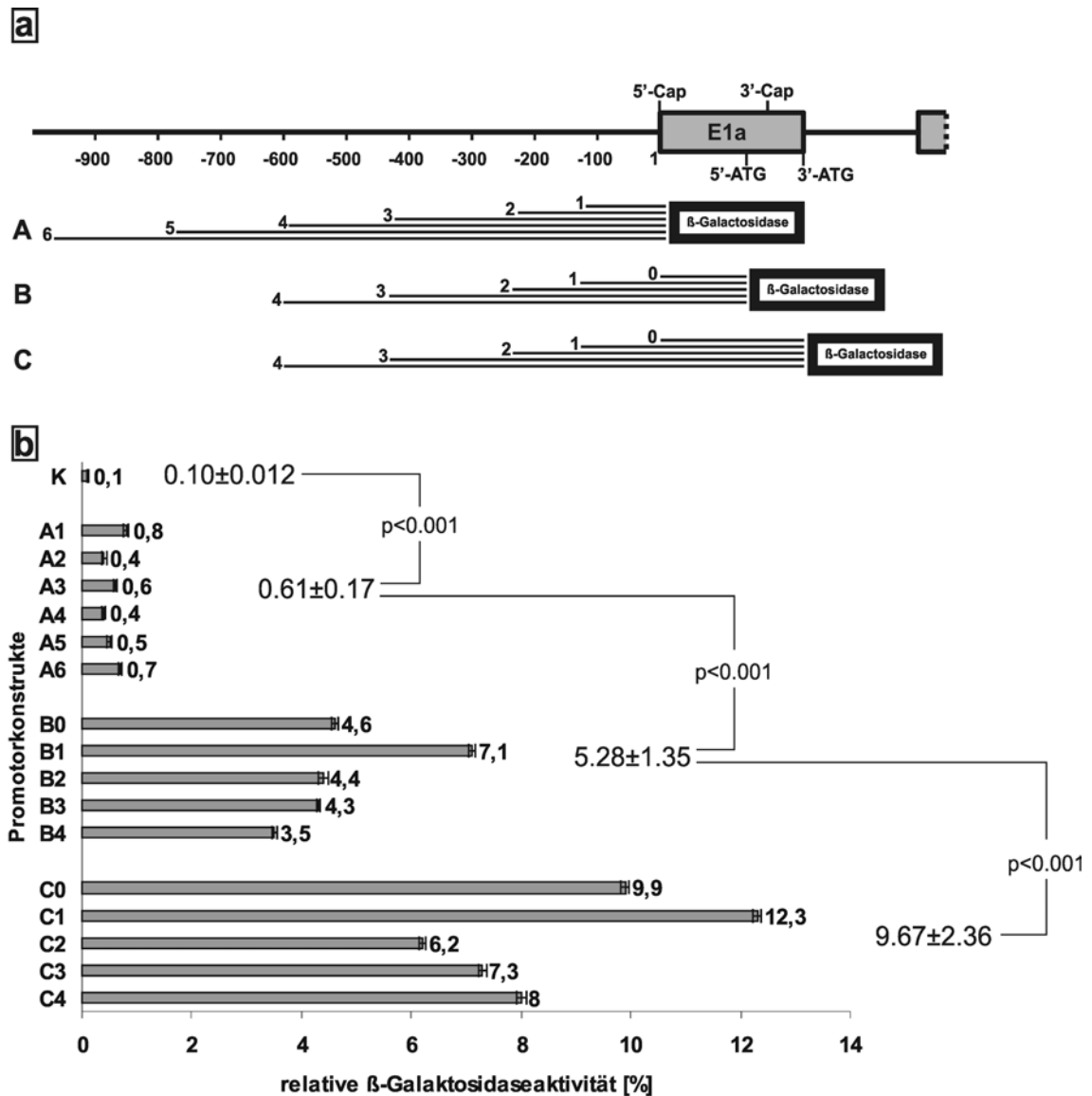


Abb. 3.13 Funktionelle Promotoranalyse der potentiellen Promotorregion für die Bildung der phGPx-Transkripte

a) Verschiedene Abschnitte der 5'-flankierenden Region bzw. Sequenzen des Exons 1a des ph/snGPx-Gens wurden in ein Reporter-gen-Vektor (β -Galaktosidase) kloniert und anschließend in HEK293 Zellen transfiziert.

b) Die Messung der Promotoraktivität erfolgte über die β -Galaktosidase. Die Werte beziehen sich auf die gemessene β -Galaktosidase-Aktivität des β -Galaktosidase-Kontrollvektors, die als 100% definiert wurde. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines Luciferase-Kontrollvektors ermittelt. Als Negativkontrolle (K) diente das Reporter-gen ohne Insert. Es wurden vier unabhängige Bestimmungen durchgeführt.

p: Signifikanz, Mittelwert der einzelnen Gruppenwerte \pm Standardabweichung

Dieser Vermutung Rechnung tragend, wurde bei der Konstruktion der Reporter-gen-Gruppe C die Region zwischen den beiden Startkodons mit berücksichtigt.

Nach transienter Transfektion der einzelnen Reporter-gen-konstrukte in die HEK293 Zellen wurde die Enzymaktivität des Reportergens über die β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Da die Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen Schwankungen unterworfen ist, wurde parallel in allen Ansätzen ein Luciferase-Kontrollvektor kotransfiziert. Dieser enthält das Luciferasegen unter Kontrolle von starken Promotor- und Enhancersequenzen (SV40). Mit Hilfe der Luciferaseaktivität wurden die einzelnen β -Galaktosidase-Aktivitäten korrigiert. Als Positivkontrolle kam ein β -Galaktosidase-Kontrollvektor unter Kontrolle von SV40-Promotorsequenzen zum Einsatz. Alle Werte beziehen sich auf diese β -Galaktosidase-Aktivität, die als 100% definiert wurde. Als Negativkontrolle diente das Reporter-gen ohne Insert.

Die 5'-flankierende Region des ph/snGPx-Gens, die sich unmittelbar stromaufwärts vom Transkriptionsstart für die mitochondriale Form befindet (Abb. 3.13, Gruppe A), zeigte nur eine geringe jedoch signifikante Promotoraktivität. Alle Promotorkonstrukte der Gruppe A zeigten ähnliche Promotoraktivitäten, unabhängig von der Länge des klonierten Sequenzabschnittes. Das kürzeste Konstrukt A1 besitzt mit einer relativen β -Galaktosidase-Aktivität von 0,8 die höchste Promotoraktivität in der Gruppe A.

Die Gruppe B von Reporter-gen-konstrukten enthält neben unterschiedlich langen Abschnitten der 5'-flankierenden Region des ph/snGPx-Gens zusätzlich die 5'-UTR des mitochondrialen Transkripts. Die Promotoraktivitäten dieser Gruppe von Konstrukten sind um eine Größenordnung höher als die der Gruppe A. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Region des ph/snGPx-Gens, die als 5'-UTR des mitochondrialen Transkripts abgelesen wird, einen wesentlichen Einfluss auf die Promotoraktivität ausübt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Promotoraktivität des Konstrukts B0 untermauert. Dieses Konstrukt beinhaltet nur die 5'-UTR des mitochondrialen Transkripts und weist eine deutlich höhere Promotoraktivität als alle Konstrukte der Gruppe A auf. Des weiteren zeigte jedes Konstrukt der Gruppe B im direkten Vergleich mit den entsprechenden Konstrukten der Gruppe A eine um eine Größenordnung höhere Promotoraktivität. Das Konstrukt B1, das nur 100 bp der 5'-flankierenden Region des ph/snGPx-Gens enthält, zeigte die größte Promotoraktivität in der Gruppe B.

Die Konstrukte der Gruppe C enthalten zusätzlich den Bereich des ph/snGPx-Gens, der sich zwischen 5'- und 3'-ATG befindet. Sequenzen dieser Region sind in beiden Transkripten wiederzufinden. Im langen Transkript kodiert dieser Bereich für die mitochondriale Insertionssequenz und für das kurze Transkript stellen Sequenzen dieser Region die 5'-UTR dar.

Die durchschnittliche Promotoraktivität dieser Konstrukte (Gruppe C) war fast doppelt so hoch, wie die der Gruppe B. Die höchste Promotoraktivität zeigte das Reportergenkonstrukt C1. Neben dem kompletten Exon 1a sind 100 bp der 5'-flankierenden Region des ph/snGPx-Gens enthalten.

Zusammenfassend kann durch die funktionelle Promotoranalyse der potentiellen Promotorregion für die Bildung der phGPx-Transkripte festgestellt werden:

- i) Die Hauptpromotoraktivität wurde im Exon 1a festgestellt. Dieses Exon umfasst die 5'-UTR des mitochondrialen Transkripts und die Sequenz, die für das mitochondriale Insertionspeptid kodiert.
- ii) Nur die ersten 100 bp stromaufwärts des 5'-Transkriptionsstarts (5'-Cap) tragen zur grundlegenden Promotoraktivität bei.
- iii) Die 5'-flankierende Region des ph/snGPx-Gens stromaufwärts des 5'-Transkriptionsstarts zeigte nur eine geringe Promotoraktivität.

3.3.2 Untersuchung der potentiellen Promotorregion für die Bildung des snGPx-Transkripts

Im Gegensatz zur phGPx, die in vielen Zellen und Geweben exprimiert wird, wurde die snGPx bisher nur im Hoden nachgewiesen (Pfeifer *et al.*, 2001). Erfolgt die Unterscheidung von phGPx und snGPx auf Transkriptionsebene, sind zum einen unterschiedliche Transkriptionsstarts und zum anderen alternative Promotorregionen für die jeweilige Isoform erforderlich.

Die potentielle Promotorregion für die Bildung des snGPx-Transkripts stellt die 5'-flankierende Region des Exons 1b dar (Abb. 3.14 a).

Die computergestützte Analyse der unmittelbar 5'-flankierenden Sequenzen (Intron 1a, 334 bp) mit Hilfe des Programms „MatInspector“ zeigte mehrere potentielle Bindungsorte mit hoher Kernsequenz-Ähnlichkeit für bekannte Transkriptionsfaktoren (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Mittels MatInspector identifizierte Transkriptionsfaktoren im Intron 1a der ph/snGPx

Transkriptionsfaktor	Position [bp] (bezugnehmend auf das snATG)	Kernsequenz (core) (basierend auf „MatInspector“)
SP1	-299 bis -302	GGCG
WT1	-295 bis -298	TGGG
GATA1	-195 bis -198	GATA
USF1	-94 bis -97	CACG
CREB	-70 bis -73	TGAC

Um festzustellen ob diese theoretischen Erkenntnisse auch mit einer entsprechenden Promotoraktivität zu belegen sind, wurden Reportergerkonstrukte hergestellt (Abb. 3.14 a). Da das Transkript der snGPx in HEK293 Zellen nachweisbar war, wurden die entsprechenden Reportergerkonstrukte in diese Zellen transfiziert. Die gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten wurde, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, mit Hilfe des kotransfizierten Luciferase-Kontrollplasmids korrigiert.

Das Reportergerkonstrukt D1, das die unmittelbar 5'-flankierende Region (Intron 1a) des Exon 1b enthält, zeigte nur eine sehr geringe Promotoraktivität (Abb. 3.14 b).

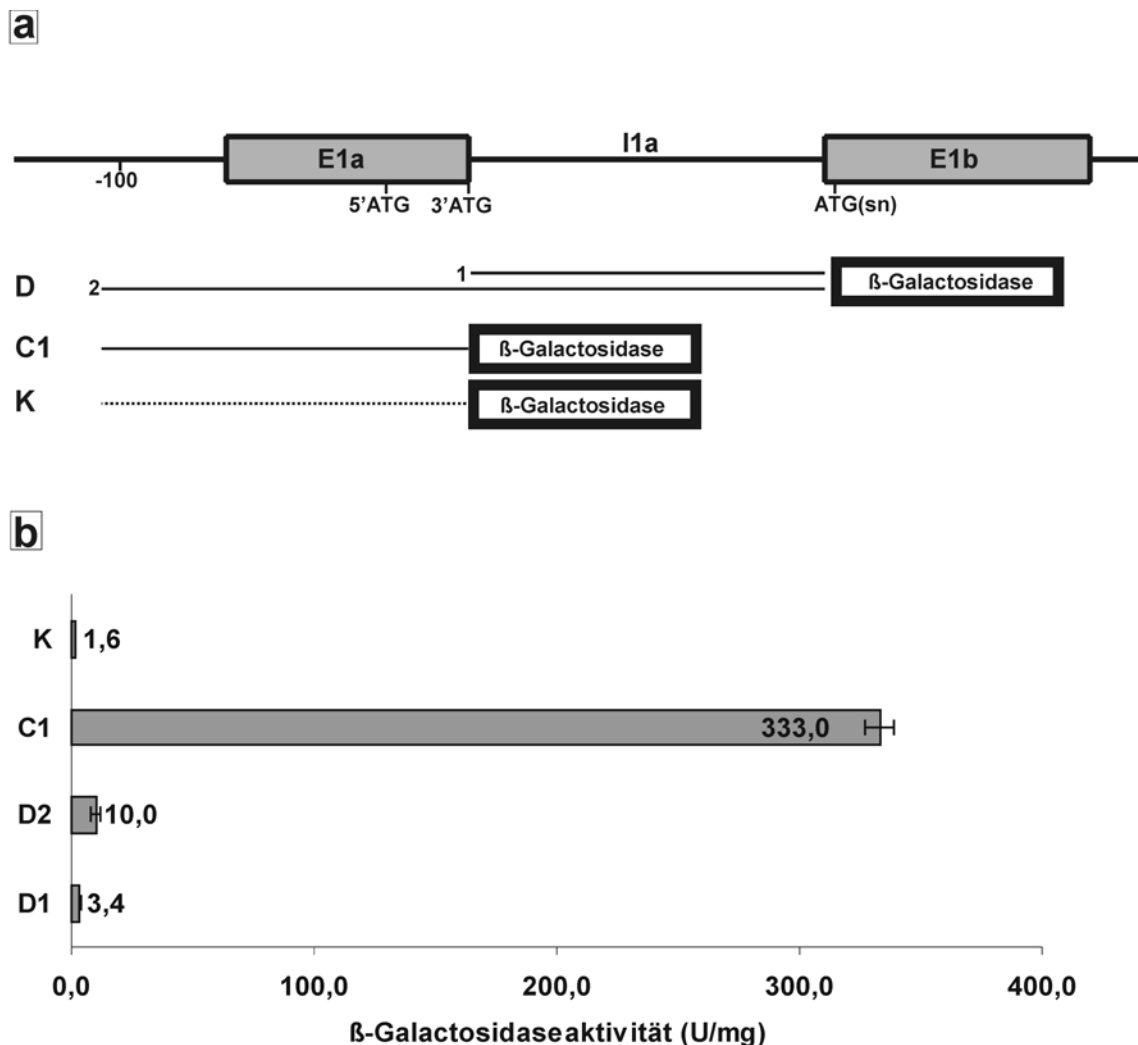


Abb. 3.14 Funktionelle Promotoranalyse der 5'-flankierenden Region des Exons 1b für die snGPx
a) Verschiedene Abschnitte der 5'-flankierenden Region des Exons 1b für die snGPx wurden in ein Reportergerkonstrukt (β -Galaktosidase) kloniert und anschließend in HEK293 Zellen transfiziert (Abschnitt 2.2.4).
b) Die Messung der Promotoraktivität erfolgte über die β -Galaktosidase-Aktivität. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe eines Luciferase-Kontrollvektors ermittelt. Als Negativkontrolle (K) diente das Reportergerkonstrukt ohne Insert. Die Werte folgen aus vier unabhängigen Versuchen.

Unter gleichen Bedingungen wurde das Reportergenkonstrukt (C1) mit der potentiellen Promotorregion für die Bildung der phGPx-Transkripte (5'-flankierende Region des ph/snGPx-Gens und das Exon 1a) untersucht. Vergleicht man die Promotoraktivitäten miteinander, ergibt sich für das Reportergenkonstrukt D1 eine um zwei Größenordnungen niedrigere Aktivität (Abb. 3.14 b).

Mit einem weiteren Reportergenkonstrukt sollte der Einfluss dieser 5'-flankierenden Region des Exons 1b der snGPx (Intron 1a) auf den phGPx-Promotor untersucht werden.

Dafür wurde ein Promotorkonstrukt (D2) kloniert, das übergreifend beide Bereiche enthielt (Abb. 3.14 a). Die nach der Transfektion gemessene β -Galaktosidaseaktivität des Konstruktes D2 entsprach nur ca. 4% der Aktivität des phGPx-Reportergenkonstruktes C1.

Aus den Transfektionsuntersuchungen kann zusammenfassend festgestellt werden:

- i) In der 5'-flankierenden Region (Intron 1a) des Exons 1b der snGPx von 334 bp ist nur eine sehr geringe Promotoraktivität nachweisbar.
- ii) Die Hauptpromotoraktivität wurde in der Region identifiziert, die das Exon 1a für die phGPx und 100 bp der angrenzenden 5'-flankierenden Region enthält.
- iii) Die Sequenzen der 5'-flankierenden Region des Exons 1b der snGPx (Intron 1a) üben einen hemmenden Einfluss auf die phGPx-Promotoraktivität aus. Diese Tatsache lässt vermuten, dass sich in dem Bereich des Introns 1a negativ regulatorische Elemente für die ph/snGPx-Expression befinden.

3.4 Untersuchung von DNA/Protein-Interaktionen in der potentiellen Promotorregion der snGPx

3.4.1 Lokalisierung von cis-regulatorischen Elementen mittels DNase-I-*in vitro*-Footprint

Die Ergebnisse der Reporter-gen-Assays für die potentielle Promotorregion des snGPx-Transkripts zeigten einen deutlichen negativ regulatorischen Einfluss dieser Region auf die Aktivität des phGPx-Promotors (3.3.2). Diese Tatsache lässt vermuten, dass in dem untersuchten Abschnitt negativ cis-regulatorische Sequenzelemente existieren, die durch die Interaktion mit entsprechenden Proteinen die Aktivität des phGPx-Promotors beeinflussen können.

Eine genauere Untersuchung von potentiellen DNA/Protein-Kontaktpunkten ist durch DNase-I-*in vitro*-Footprint (DNA-Schutzexperimente) möglich. Beim Footprint werden Zellkernproteine mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert. Anschließend erfolgt ein partieller Verdau der DNA mit DNase I. Sind Kernproteine an der DNA gebunden, schützen diese den entsprechenden DNA-Bereich vor einem Abbau durch DNase I. In diesem Fall können Fragmente bestimmter Länge nicht nachgewiesen werden. Es entstehen im Autoradiogramm Regionen, die im Vergleich zum DNase-I-Verdau der DNA ohne Inkubation mit den entsprechenden Proteinen, keine Spaltfragmente zeigen.

Die für den Nachweis von cis-regulatorischen Elementen eingesetzten DNA-Bereiche sind in Abb. 3.15 dargestellt.

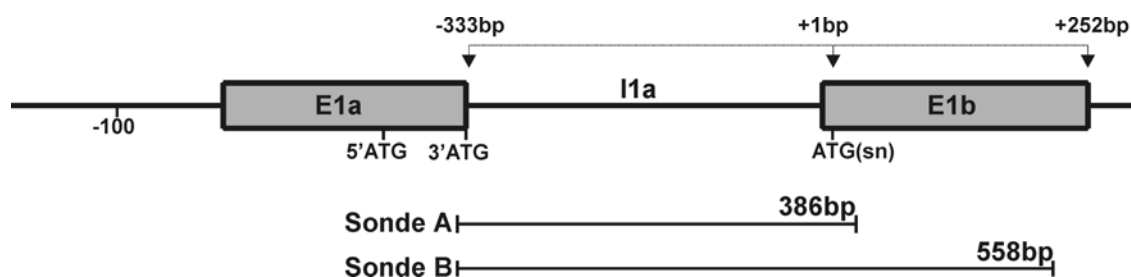


Abb. 3.15 Mit DNase-I-*in vitro*-Footprint untersuchten Abschnitte des ph/snGPx-Gens

Die Sonde A mit 334 bp umfasst überwiegend den Intron 1a-Bereich des ph/snGPx-Gens. Die Sonde B enthält zusätzlich Bereiche des Exons 1b für die snGPx. Beide Fragmente wurden nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gereinigt und mit ^{32}P einsträngig markiert (Abschnitt 2.2.5).

Da die negativ regulatorische Wirkung von Intron 1a-Bereichen auf die Promotoraktivität der phGPx in HEK293 Zellen nachgewiesen wurde, erfolgte die Isolierung der Kernproteine aus diesen Zellen. Des weiteren wurden Kernproteine aus dem Hoden der Maus isoliert, da die snGPx bisher nur im Hoden nachgewiesen wurde (Pfeifer *et al.*, 2001). Nach Inkubation der einsträngig markierten Sonde A mit den jeweiligen Kernproteinen, DNase-I-Verdau und

elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente konnten fünf geschützte DNA-Bereiche (FP 1 - FP 5) identifiziert werden (Abb. 3.16 A). Ein Vergleich der Reaktionsansätze (Hoden, HEK293) mit dem Kontrollverdau der Sonde zeigte deutlich die fehlenden DNA-Fragmente.

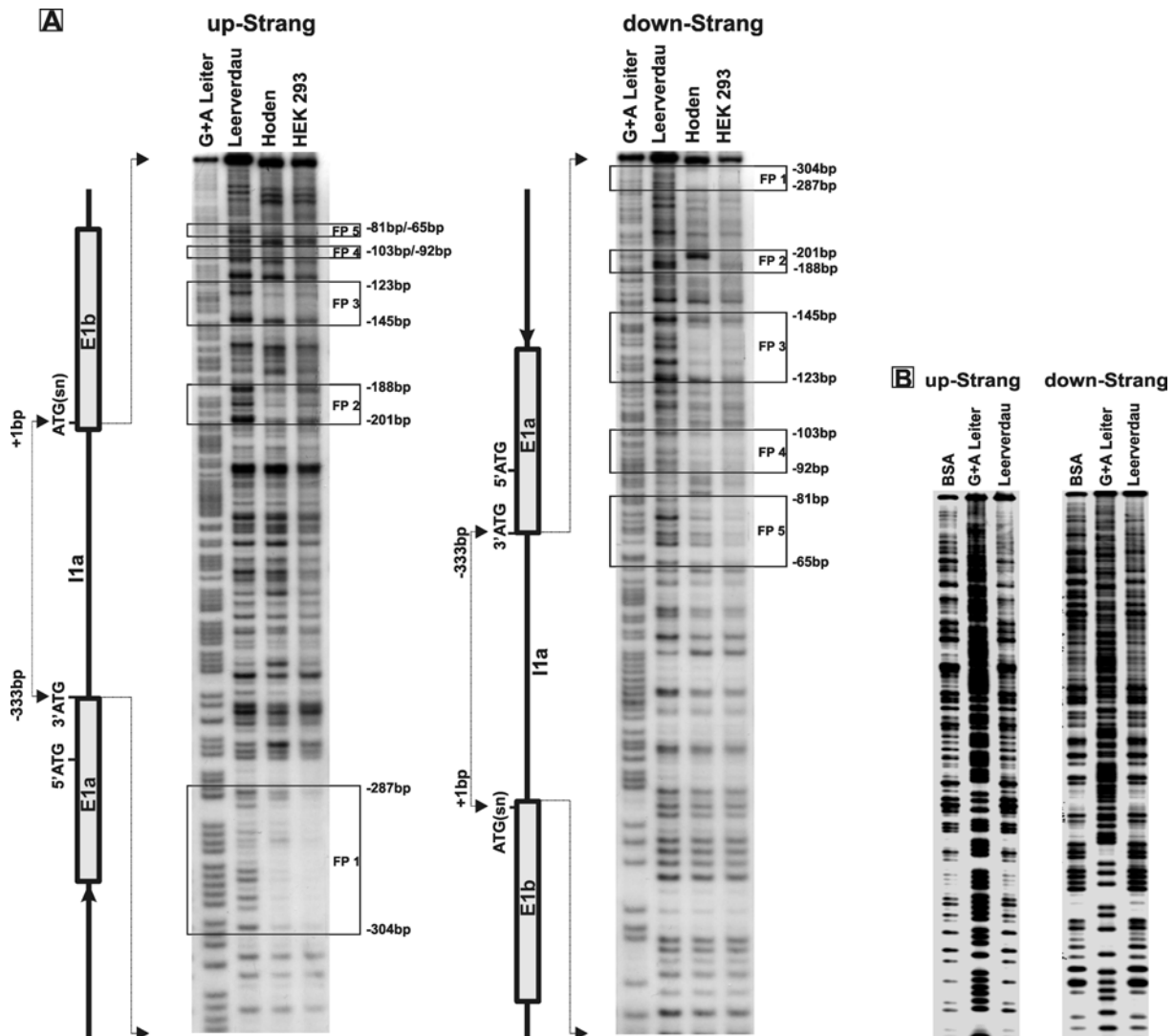


Abb. 3.16 DNase-I-*in vitro*-Footprint Analyse des Introns 1a (Sonde A) des ph/snGPx-Gens

A Die Sonde wurde entweder am up-Strang oder am down-Strang mit ^{32}P markiert (Abschnitt 2.2.5), ca. 20.000 cpm der Sonde mit 100 μg nukleären Extrakt (Maus-Hoden oder HEK293) inkubiert und anschließend mit DNase I partiell verdaut. Die Extraktion der DNA-Fragmente erfolgte mit Phenol/Chloroform. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem 6% -igen Polyacrylamid-Sequenziergel, Exposition auf einem Röntgenfilm und anschließendem Vergleich mit dem Leerverdau (ohne Protein) konnten auf beiden Strängen jeweils fünf Footprintregionen (FP 1 - FP 5) nachgewiesen werden. Die genaue Sequenzzuordnung der jeweiligen Footprintregion erfolgte mit Hilfe der G+A Sequenzierreaktion nach Maxam & Gilbert (1992).

B Um unspezifische DNA/Protein-Wechselwirkungen auszuschließen, wurde die jeweilige Sonde mit je 100 μg BSA unter gleichen Bedingungen wie unter **A** behandelt. Der direkte Vergleich der Proben Leerverdau (ohne Kernprotein) und der BSA-Probe zeigten keine geschützten DNA-Bereiche.

Sowohl der markierte up-Strang als auch der markierte down-Strang zeigten die gleichen Footprintregionen.

Mit Hilfe des G+A-Musters aus der chemischen Sequenzierung (Maxam & Gilbert, 1992) konnte die genaue Position der Bindungsregion ermittelt werden.

Um unspezifische DNA/Protein-Wechselwirkungen in der untersuchten Intron 1a-Region auszuschließen, wurde parallel ein Reaktionsansatz mit BSA inkubiert und unter gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Dabei konnten im Vergleich zum Leerverdau keine geschützten Regionen identifiziert werden (Abb. 3.16 B).

Die Sonde B enthält zusätzlich weite Bereiche des Exons 1b der snGPx (Abb. 3.15). Interessanter Weise konnte in diesem DNA-Abschnitt eine weitere geschützte Region (FP 6) nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Ein Vergleich mit dem Leerverdau zeigte bei beiden Reaktionsansätzen mit nukleären Extrakten einen geschützten DNA-Bereich in dem kodierenden Exon 1b der snGPx.

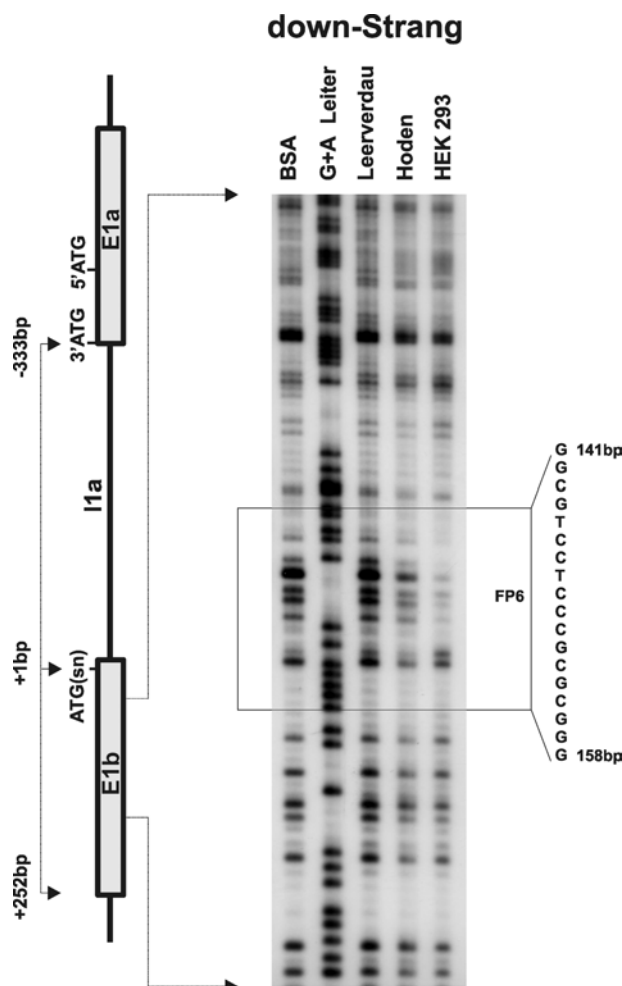


Abb. 3.17 DNase-I-*in vitro*-Footprint Analyse des Exons 1b (Sonde B) des ph/snGPx-Gens

Der down-Strang der Sonde B wurde mit ^{32}P markiert und anschließend wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben mit Kernprotein der HEK293 Zellen oder des Mausehodens inkubiert, partiell mit DNase I verdaut und die entstehenden DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente ein Inkubationsansatz ohne Kernprotein. Unspezifische DNA/Protein-Wechselwirkungen konnten durch einen Reaktionsansatz mit BSA ausgeschlossen werden. Die genaue Position des geschützten Bereichs wurde mit Hilfe der G+A Sequenzierungsreaktion nach Maxam & Gilbert (1992) bestimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in dem untersuchten Abschnitt des ph/snGPx-Gens (Intron 1a und Exon 1b) sechs geschützte DNA-Bereiche nachgewiesen werden konnten.

Die isolierten Kernproteine aus dem Maus-Hoden und den HEK293 Zellen enthalten beide Proteine, die an den identifizierten DNA-Regionen binden und somit den DNase I-Verdau in diesen Bereichen verhindern.

3.4.2 Identifizierung von trans-regulatorischen Proteinen mittels Gelshift Assay

Durch die DNase-I-Footprint Analyse des Introns 1a und Exons 1b wurden Sequenzbereiche identifiziert, an denen Kernproteine binden. Für die Identifizierung dieser Kernproteine erfolgte zuerst die theoretische Untersuchung dieser Footprintregionen mit dem MatInspector-Programm (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Untersuchung der identifizierten Footprintregionen mit dem MatInspector-Programm
Für die einzelnen Footprintregionen ist theoretisch die Bindung mehrerer Transkriptionsfaktoren möglich. Die Faktoren mit der größten Übereinstimmung (Kernsequenz-Ähnlichkeit) sind fett hervorgehoben.

Regionen	Sequenz	MatInspector-Analyse
FP 1	5' -GGG TGG GGG CGG GGT TCG G-3'	SP1, EGR/WT1
FP 2	5' -GCC TGA TAG GCA T-3'	GATA1, LMO2COM,
FP 3	5' -TTG GGC GGT GAG AAC CGG TGT CGG GG-3'	SREBP1, VMYB, USF
FP 4	5' -CCT GGT CAC GCG-3'	USF1, AHRARNT,
FP 5	5' -CCT GGT GCG TCA CAG TC-3'	CREB, AP1, AP1FJ
FP 6	5' -CCG CAG GAG GGC GCG CCC-3'	SP1, WT1, EGR,

In den folgenden Experimenten wurden die Transkriptionsfaktoren näher untersucht, deren Bindemotive die größte Ähnlichkeit mit der untersuchten Sequenz aufwiesen (Kernsequenz-Ähnlichkeit).

Eine geeignete Methode für die Identifizierung sequenzspezifisch bindender Proteine ist der Gelshift Assay. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, dass DNA-Moleküle in einer nativen Gelelektrophorese langsamer wandern, wenn diese ein oder mehrere Proteine an sich gebunden haben.

Als DNA-Sonden wurden anhand der Footprintsequenzen komplementäre Oligonukleotide hergestellt, dimerisiert und anschließend mit Digoxigenin markiert. Nach Inkubation der markierten DNA-Sonde mit den entsprechenden Kernproteinen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und Detektion (2.2.6).

3.4.2.1 Die Footprintregion FP 1 im Gelshift Assay

Zunächst sollte untersucht werden, ob auch im Gelshift Assay DNA/Protein-Wechselwirkungen in dieser Region nachgewiesen werden können. Dafür erfolgte die Inkubation der markierten Gelshift-Sonde FP 1 mit Kernprotein aus dem murinen Hoden. Im Vergleich zur freien Sonde zeigte sich eine deutlich nach oben verschobene Bande (Shift) (3.18 B). Um zu prüfen ob es sich um eine spezifische Bande handelt, wurden kompetetive Gelshifts durchgeführt. Durch Zugabe eines 160fachen Überschusses unmarkierter Sonde (Kompetitor) in den gleichen Inkubationsansatz konkurriert diese mit der markierten Sonde um die Bindung des Proteins. Nur spezifische DNA/Protein-Komplexe mit der markierten Sonde lassen sich durch einen Überschuss an unmarkierter Sonde aufheben. Der bei einer Inkubation mit Kernproteinen aus dem murinen Hoden entstandene Shift ließ sich auf diese Weise aufheben und ist somit spezifisch.

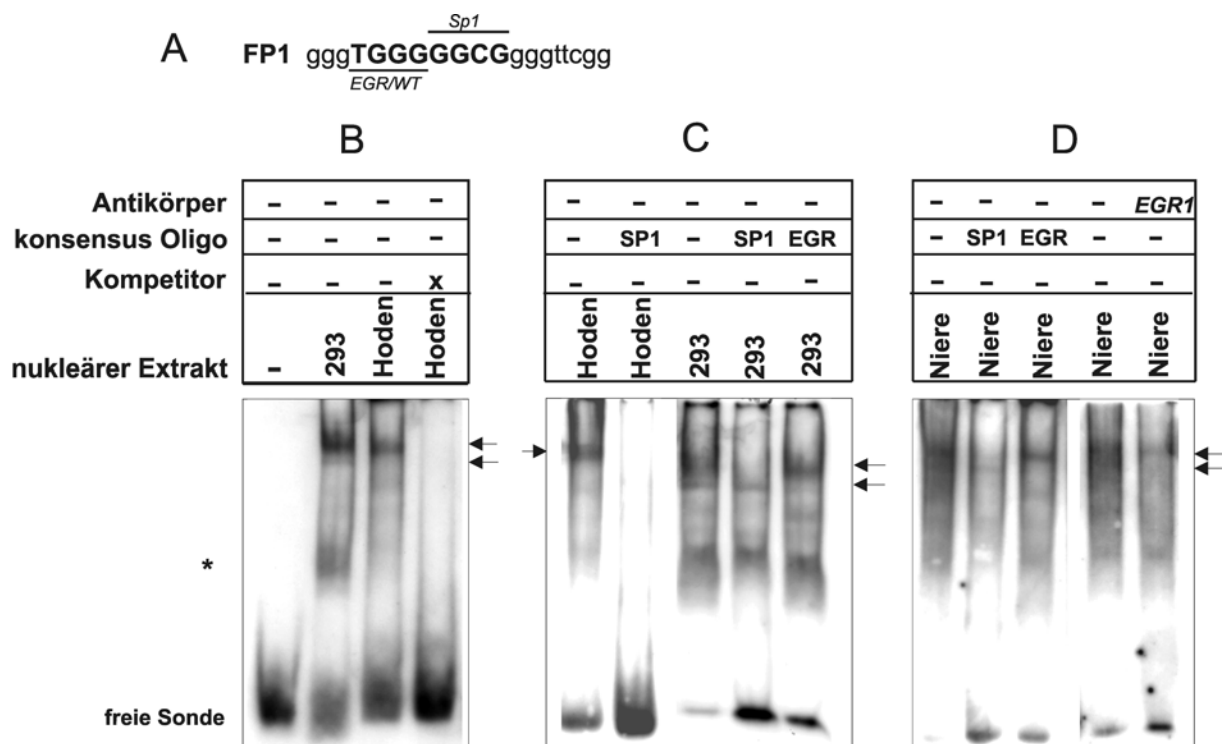


Abb. 3.18 Gelshift Assay der Footprintregion FP 1

Die mit Digoxigenin markierte Sonde für FP 1 wurde mit ca. 10 µg Kernprotein aus dem murinen Hoden, Niere oder HEK293 Zellen inkubiert, in einem 5% -igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt und detektiert (Abschnitt 2.2.6).

A) Aus Abb. 3.16 A identifizierte Footprintregion FP 1 mit den überlappenden Konsensus-Bindungssequenzen für SP1 und EGR/WT.

B)-D) Inkubationsansätze für die Identifizierung der DNA-bindenden Proteine

Die unmarkierte Sonde (Kompetitor) und die Konsensus-Oligonukleotide wurden in einem 160fachen Überschuss eingesetzt. Vom EGR1-Antikörper kamen 2 µg/Inkubationsansatz zum Einsatz. Die Pfeile kennzeichnen die im Vergleich mit der freien Sonde nach oben verschobenen Banden (Shift). Der Stern markiert nicht identifizierte Shifts.

Die Inkubation der markierten Sonde mit Kernproteinen aus HEK293 Zellen führte ebenfalls zu einer deutlichen Bande in vergleichbarer Höhe. Zusätzlich ist jedoch noch ein schwächerer Shift, direkt unter der intensiven Bande zu erkennen (3.18 B).

Nachdem die Bindung von Kernproteinen an der FP 1-Region auch im Gelshift Assay gezeigt werden konnte, sollten nun diese Proteine identifiziert werden. Daher wurden kompetitive Gelshifts mit Konsensus-Oligonukleotiden durchgeführt. Diese Oligonukleotide enthalten die Konsensus-Bindemotive für die entsprechenden Proteine. Die theoretische Untersuchung des FP 1 mit dem MatInspector nach möglichen Bindemotiven für Transkriptionsfaktoren zeigte die Konsensus-Bindungssequenz für das Stimulierende Protein SP1 und dem EGR/WT1 Transkriptionsfaktor (Abb. 3.18 A).

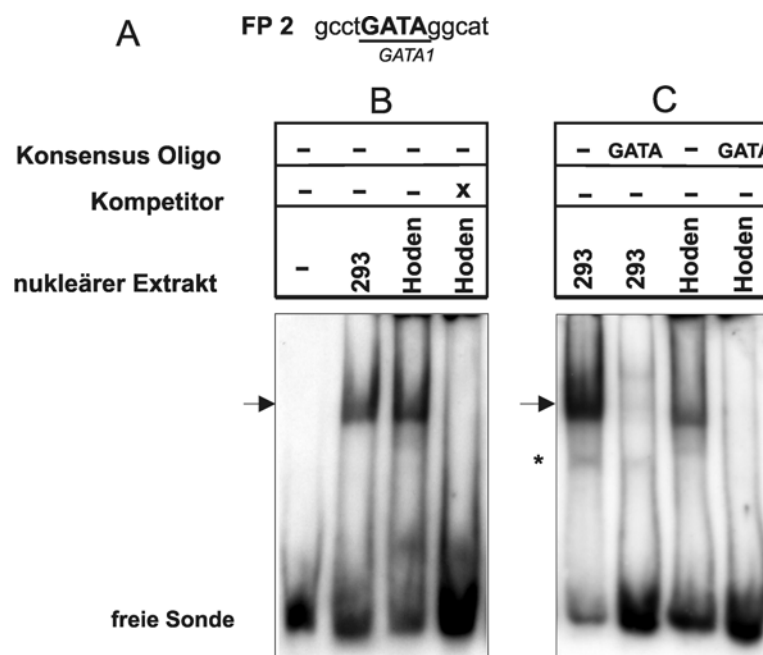
Eine Inkubation der markierten FP 1-Sonde mit Kernproteinen aus dem Maus-Hoden unter gleichzeitigem Überschuss an Konsensus-Oligonukleotiden für den Faktor SP1 führte zur Aufhebung des Shifts (3.18 C). Die markierte FP 1-Sonde konkurriert folglich mit dem SP1 Konsensus-Oligonukleotid um den gleichen Transkriptionsfaktor, dem Stimulierenden Protein SP1.

Das gleiche Experiment wurde mit Kernproteinen der HEK293 Zellen durchgeführt. Durch einen Überschuss des SP1-Konsensus-Oligonukleotids konnte die intensive obere Bande aufgehoben werden. Die untere schwächere Bande blieb jedoch unverändert. Ein 160facher Überschuss des Konsensus-Oligonukleotids für die Familie der EGR-Transkriptionsfaktoren führte zur Aufhebung der unteren Bande. Dagegen blieb die obere Bande unbeeinflusst (Abb. 3.18 C).

Da die HEK293 Zellen embryonale Zellen sind, sollte in einem nächsten Experiment geprüft werden, ob auch in der adulten Maus-Niere die entsprechenden Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Wie in Abb. 3.18 D gezeigt wird, konnten auch mit den Kernproteinen der adulten Maus-Niere beide Banden nachgewiesen werden. Die obere Bande ließ sich durch ein SP1-Konsensus-Oligonukleotid und die untere durch einen Konsensus-Oligonukleotid für die EGR-Familie aufheben.

In einem zusätzlichen Experiment wurde neben den Kernproteinen der Niere ein EGR1-Antikörper dem Inkubationsansatz zugesetzt. Mit diesem sogenannten Supershift-Assay sollte versucht werden, die Beteiligung des EGR1-Proteins an dem zweiten Bandshift-Komplex mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachzuweisen. Ist der fragliche Transkriptionsfaktor tatsächlich an dem DNA/Protein-Komplex beteiligt, erhält man durch die zusätzliche Bindung des Antikörpers eine oberhalb des ursprünglichen Komplexes liegende Bande (Supershift). Häufig kommt es vor, dass durch die Bindung des Antikörpers an das Protein die Bildung des

Als nächstes wurde die Footprinregion FP 2 im Gelshift Assay untersucht. Diese Region enthält ein GATA1-Bindungsmotiv (Abb. 3.19 A). Nach der Inkubation des markierten Gelshift-Oligonukleotids FP 2 mit den Kernproteinen der HEK293 Zellen oder des Maus-Hodens konnte bei beiden eine deutlich zur freien Sonde verschobene Bande nachgewiesen werden (Abb. 3.19 B). Da diese Bande mit einem Überschuss an unmarkierter Sonde FP 2 (Kompetitor) aufgehoben wurde, stellt diese einen spezifischen DNA/Protein-Komplex dar.



Die unmarkierte Sonde (Kompetitor) und das Konsensus-Oligonukleotid für die GATA-Familie wurden in einem 160fachen Überschuss eingesetzt. Die Pfeile kennzeichnen die im Vergleich mit der freien Sonde nach oben verschobenen Bande (Shift). Der Stern markiert nicht identifizierte Shifts.

75

Die Identifizierung des bindenden Proteins an der FP 3-Region erfolgte wie für die FP 2-Region. Die markierte Gelshift Sonde FP 3 wurde mit Kernproteinen des Maus-Hodens und der HEK293 Zellen inkubiert. Mit beiden nukleären Extrakten konnte eine deutlich retardierte Bande nachgewiesen werden. Ein Überschuss der unmarkierten FP 3-Sonde (Kompetitor) im Inkubationsansatz führte durch die konkurrierende Bindung des Proteins an dieser Sonde zur Aufhebung der Bande (Abb. 3.20 B).

3.4.2.3 Die Footprintregionen FP 4 und FP 5 im Gelshift Assay

Die Footprintregionen FP 4 und FP 5 enthalten die Konsensus-Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren USF1 beziehungsweise CREB (Abb. 3.21 A+B). Nach der Inkubation der markierten Sonden FP 4 und FP 5 mit Kernproteinen des Maus-Hodens und der HEK293 Zellen konnte die Bildung von DNA/Protein-Komplexen nachgewiesen werden (Abb. 3.21 C+D). Die Spezifität dieser Komplexe wurde, wie bereits bei den anderen Gelshifts beschrieben, durch die Inkubation mit den jeweiligen unmarkierten Sonden überprüft (nicht abgebildet).

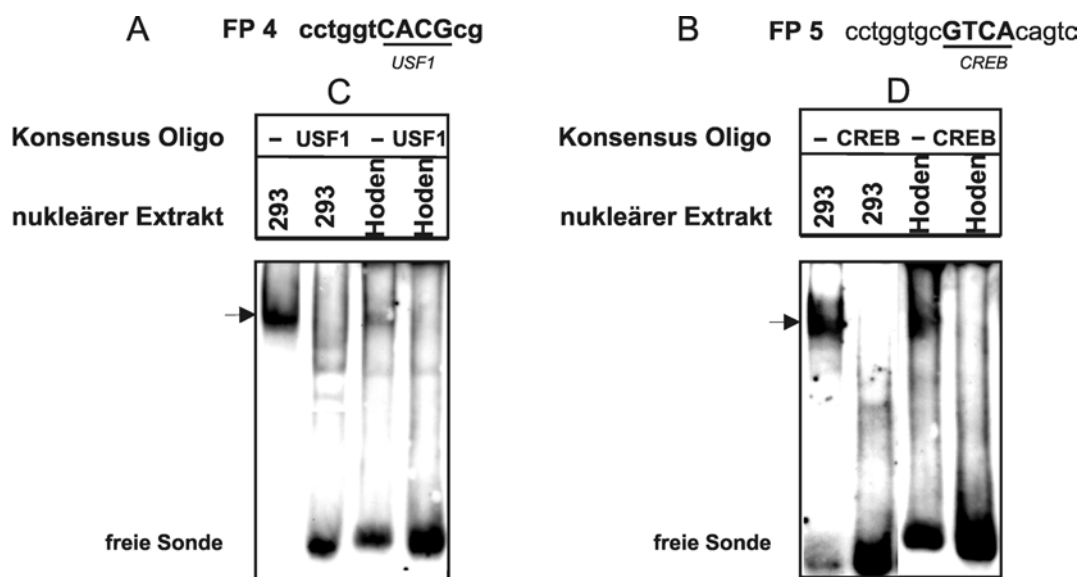


Abb. 3.21 Gelshift Assay der Footprintregionen FP 4 und FP 5

Die mit Digoxigenin markierte Sonden für FP 4 und FP 5 wurde mit ca. 10 µg Kernprotein aus dem murinen Hoden oder HEK293 Zellen inkubiert, in einem 5% -igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt und detektiert (Abschnitt 2.2.6).

A)+B) Aus Abb. 3.16 A identifizierte Footprintregionen FP 4 und FP 5 mit den Konsensus-Bindungssequenzen für USF1 und CREB

C)+D) Inkubationsansätze für die Identifizierung der DNA-bindenden Proteine

Die Konsensus-Oligonukleotide für USF1 und CREB wurden in einem 160fachen Überschuss eingesetzt. Mit den Pfeilen sind die im Vergleich mit der freien Sonde nach oben verschobenen Banden (Shift) gekennzeichnet. Der Stern markiert nicht identifizierte Shifts.

Für die Identifizierung der bindenden Proteine wurde das USF1-Konsensus-Oligonukleotid mit den Kernproteinen des Maus-Hodens und der HEK293 Zellen vorinkubiert und anschließend die markierte FP 4-Sonde zugegeben. Unter diesen Bedingungen war, keine verschobene Gelshiftbande zu beobachten (Abb 3.21 C). Nach einer Vorinkubation des Konsensus-Oligonukleotids für die CREB-Familie mit entsprechendem Kernprotein konnte auch für die FP 5-Sonde keine verschobene Gelshiftbande mehr nachgewiesen werden (Abb 3.21 D). Die eingesetzten Konsensus-Oligonukleotide haben die entsprechenden

Kernproteine (USF1 und CREB-Familie) aus den nukleären Extrakten gebunden, so dass für die markierten Gelshift-Sonden nicht mehr genug Protein zu Bildung der entsprechenden DNA/Protein-Komplexe zur Verfügung stand.

3.4.2.4 Die Footprintregion FP 6 im Gelshift Assay

Im DNase-I-*in vitro*-Footprint konnte auch in der kodierenden Sequenz des Exons 1b DNA/Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Eine Analyse der identifizierten Sequenz mit der MatInspector-Datenbank zeigte in dieser Region eine überlappende SP1- und EGR/WT1-Bindungssequenz (Abb. 3.22 A). Mit dem Gelshift Assay sollte nun die Bindung von Kernproteinen bestätigt und identifiziert werden.

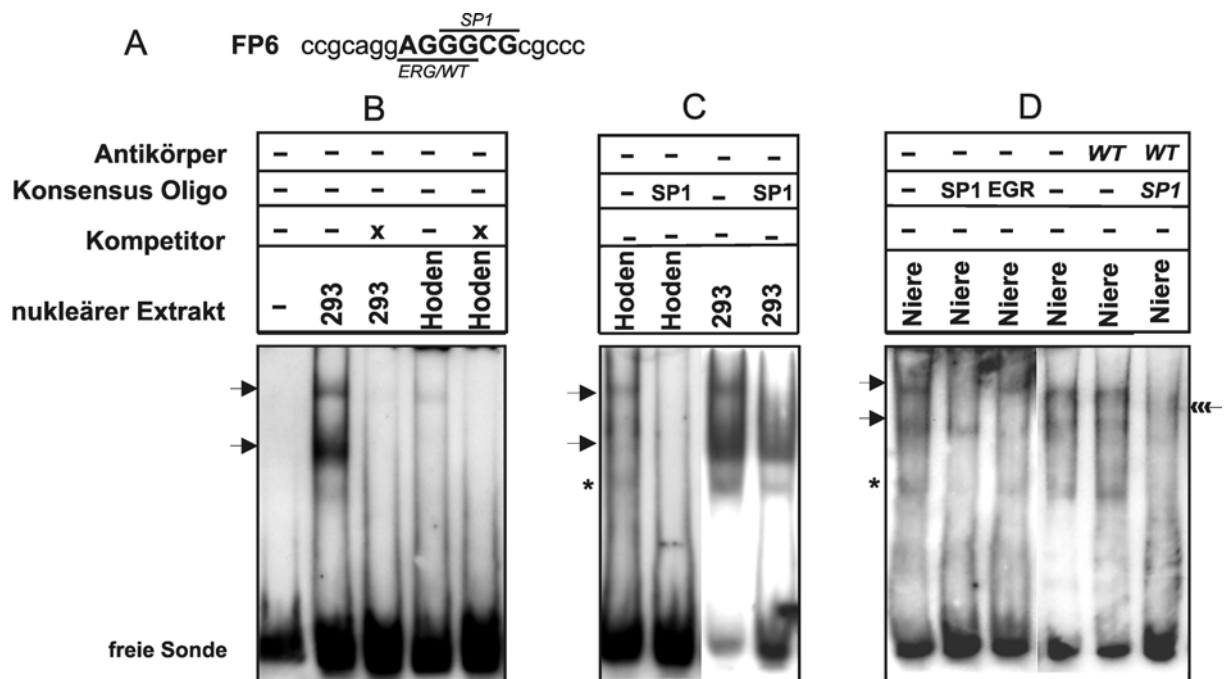


Abb. 3.22 Gelshift Assay der Footprintregion FP 6

Die mit Digoxigenin markierte Sonde für FP 6 wurde mit ca. 10 µg Kernprotein aus dem murinen Hoden, Niere oder HEK293 Zellen inkubiert, in einem 5% -igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt und detektiert (Abschnitt 2.2.6).

A) Aus Abb. 3.16 A identifizierte Footprintregion FP 6 mit den überlappenden Konsensus-Bindungssequenzen für SP1 und EGR/WT1.

B)-D) Inkubationsansätze für die Identifizierung der DNA-bindenden Proteine

Die unmarkierte Sonde (Kompetitor) und die Konsensus-Oligonukleotide wurden in einem 160fachen Überschuss eingesetzt. Vom WT1-Antikörper kamen 2 µg/Inkubationsansatz zum Einsatz. Die Pfeile kennzeichnen die im Vergleich mit der freien Sonde nach oben verschobenen Banden (Shift). Der Supershift ist mit einer mehrfachen Pfeilspitze gekennzeichnet. Der Stern markiert nicht identifizierte Shifts.

Die Inkubation der markierten FP 6-Gelshift-Sonde mit Kernproteinen des Maus-Hodens führte zu einer im Vergleich zur freien Sonde verschobenen Bande, die durch Vorinkubation mit einem Überschuss an unmarkierter Sonde verhindert werden konnte (Abb. 3.22 B). Der

Einsatz von Kernprotein aus den HEK293 Zellen führte dagegen zu zwei deutlich retardierten Banden. Der obere DNA/Protein-Komplex befindet sich auf der gleichen Höhe mit dem gebildeten Komplex bei Einsatz des testikulären Kernproteins. Das Verschwinden beider Banden durch Vorinkubation mit der unmarkierten Gelshift-Sonde zeigte auch hier, dass es sich um spezifische DNA/Protein-Wechselwirkungen handelte (Abb. 3.22 B).

Für die Identifizierung der bindenden Proteine wurden zuerst kompetitive Gelshifts mit dem Konsensus-Oligonukleotid für das Stimulierende Protein SP1 durchgeführt (Abb. 3.23 C). Die Bildung des DNA/Protein-Komplexes durch Inkubation mit Kernprotein aus dem Maus-Hoden wurde unter diesen Bedingungen verhindert. Bei Einsatz des nukleären Extraktes aus den HEK293 Zellen blieb die Bildung des in gleicher Höhe migrierenden DNA/Protein-Komplexes aus. Die zweite Bande blieb bei einer Inkubation mit dem SP1-Konsensus-Oligonukleotid bestehen. Bei beiden nukleären Extrakten ist der Transkriptionsfaktor SP1 an der Entstehung eines Gelshifts mit der markierten FP 6-Sonde beteiligt.

Wie beim Gelshift mit der FP 1-Sonde sollte auch bei der FP 6-Sonde überprüft werden, ob die bindenden Kernproteine aus embryonalen Nierenzellen auch in adulten Nierenzellen vorhanden sind. Hierfür wurden Gelshifts mit Kernproteinen aus der Maus-Niere durchgeführt. Auch mit diesen Kernproteinen wurden zwei retardierte Banden identifiziert (Abb. 3.23 D). Die Bildung des oberen Komplexes ließ sich ebenfalls durch die Vorinkubation mit dem SP1-Konsensus-Oligonukleotid verhindern, welches die Bindung des Stimulierenden Proteins SP1 an das FP 6-Gelshift-Oligonukleotid wahrscheinlich macht.

Für die Identifizierung des zweiten Gelshift-Komplexes wurde ein Inkubationsansatz mit dem Konsensus-Oligonukleotid für die EGR-Familie inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde der zweite DNA/Protein-Komplex aufgehoben. Die obere retardierte Bande blieb unbeeinflusst (Abb. 3.23 D). Um das Mitglied der EGR-Familie zu identifizieren, erfolgte ein Super-shift-Assay. Die Vorinkubation mit einem WT1-Antikörper zeigte zunächst keine sichtbaren Veränderungen in der Entstehung der Gelshift-Banden. Bei gleichzeitiger Zugabe des SP1-Konsensus-Oligonukleotids und des WT1-Antikörpers wurde, wie bereits erläutert, der obere DNA/SP1-Komplex aufgehoben. Die untere Bande wurde unter diesen Bedingungen etwas nach oben verschoben (Abb. 3.23 D). Diese Tatsache spricht für die Bindung des Antikörpers an das Protein. Gemeinsam erfolgt die Bindung an das markierte FP 6-Oligonukleotid und die Entstehung eines in der Molmasse größeren DNA/Protein-Komplexes als ohne Antikörper.

3.4.2.5 Nachweis von *in vivo* DNA/Protein-Bindungen mittels Chromatin Immunopräzipitation

Die bisherigen Untersuchungen mittels DNase-I-*in vitro*-Footprint und Gelshift Assay (3.4.1, 3.4.2) zeigten die Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren, die *in vitro* an den entsprechenden cis-regulatorischen Sequenzen der 5'-flankierenden Region des Exons 1b bzw. im Exon 1b binden. Es stellte sich jedoch die Frage, ob diese Bindungen auch tatsächlich *in vivo* stattfinden.

Eine geeignete Methode zur Untersuchung von *in vivo* DNA/Protein-Wechselwirkungen ist die Chromatin Immunopräzipitation. Dafür wurden die DNA-bindenden Kernproteine der HEK293 Zellen durch eine Behandlung mit Formaldehyd kovalent an die genomische DNA gebunden. Nach der Kernpräparation erfolgte die Zerteilung der genomischen DNA mit den gebundenen Proteinen durch Ultraschall in Fragmente zwischen 500-1000 bp. Die anschließende Immunopräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen den entsprechenden Transkriptionsfaktor ermöglichte eine Selektion der Fragmente, an denen das Kernprotein gebunden war. Nach Auflösung der kovalenten DNA/Proteinbindung wurden die isolierten DNA-Fragmente gefällt, in Wasser aufgenommen und anschließend mit PCR unter Verwendung von ph/snGPx-spezifischen Primern analysiert. Auf diese Weise erfolgte die Untersuchung der im Gelshift Assay identifizierten Transkriptionsfaktoren EGR1 und SREBP1. Die Position der Bindungsorte für das jeweilige Kernprotein und die genutzten Primer sind in Abb. 3.23 A zusammengefasst.

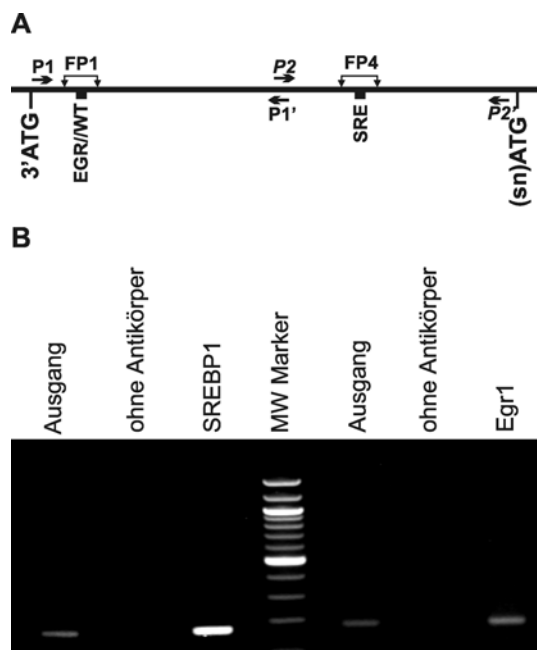


Abb. 3.23 Chromatin Immunopräzipitation ausgewählter Transkriptionsfaktoren

A) Darstellung der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren EGR1 und SREBP1. Die Pfeile zeigen die Position der Primer, die für die Amplifizierung der immunopräzipitierten ph/snGPx-spezifischen Regionen eingesetzt wurden (P1/P1' 169bp, P2/P2' 185bp, Abschnitt 2.2.7).

B) PCR Produkte der in A) abgebildeten Bereiche des ph/snGPx-Gens. Als Ausgang wurde ein Teil der mit Ultraschall zerkleinerten genomischen DNA vor der Immunopräzipitation aufgearbeitet und für die PCR eingesetzt. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die parallel zur Immunopräzipitation aufgearbeitet wurde, jedoch ohne Antikörper. Die DNA/Protein-Komplexe wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen EGR1 und SREBP1 immunopräzipitiert und die genomische DNA mit ph/snGPx-spezifischen Primern amplifiziert. Die Produkte wurden in einem 2% -igen Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert.

Unter Nutzung der spezifischen Antikörper für EGR1 und SREBP1 konnte eine *in vivo* Bindung dieser Faktoren an der genomischen ph/snGPx-DNA in HEK293 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.23 B). Im Gegensatz dazu zeigte der parallel aufgearbeitete Ansatz ohne spezifischen Antikörper kein PCR-Signal, so dass eine vom Antikörper unabhängige Verschleppung genomischer DNA während der Aufarbeitung ausgeschlossen werden konnte.

3.5 Gewebespezifische Expression und intrazelluläre Lokalisierung der snGPx

3.5.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion der phGPx und snGPx verschiedener muriner Gewebe

Derzeit sind drei verschiedene Transkripte des ph/snGPx-Gens bekannt. Die Nutzung verschiedener potentieller Startkodons führt zur Bildung der zytosolischen und mitochondrialen Form der phGPx sowie zu der erst kürzlich entdeckten snGPx, die in den Kernen der späten Spermatiden nachgewiesen wurde (Pfeifer *et al.*, 2001). Im Northern Blot konnte gezeigt werden, dass die zytosolische Form der phGPx in vielen Zellen und Geweben transkribiert wird. Dagegen ließ sich die mitochondriale Form der phGPx mit dieser Methode nur im Hoden nachweisen (Knopp *et al.*, 1999). Das Transkript der snGPx konnte im Northern Blot nur im Hoden gezeigt werden (Pfeifer *et al.*, 2001).

Eine weitaus empfindlichere Methode zur Untersuchung der Gewebeverteilung der Transkripte des ph/snGPx-Gens stellt die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) dar. Hierbei wird die mRNA der zu untersuchenden Zellen oder Gewebe mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in den entsprechenden cDNA-Strang umgeschrieben und anschließend für die PCR mit ph/snGPx-spezifischen Primern eingesetzt.

Als RNA-Quelle für die folgenden Untersuchungen wurden verschiedene murine Gewebe genutzt. Durch die PCR mit genspezifischen Primern für die ubiquitär vorkommenden murinen GAPDH wurde die Qualität der Reversen Transkription überprüft (Abb. 3.24).

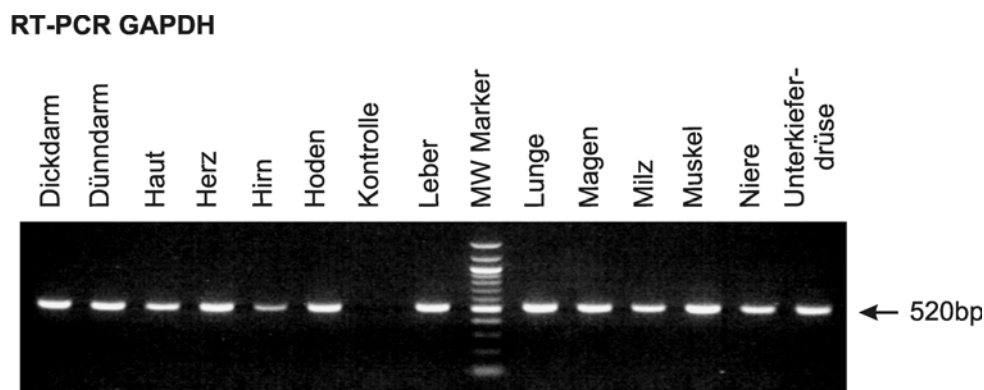


Abb. 3.24 Kontrolle der Reversen Transkription mit genspezifischen Primern der murinen GAPDH

Nach der Präparation der Gesamt-RNA aus den einzelnen Geweben und Reverser Transkription wurden die entsprechenden RT-Produkte (1 μ l) mit murinen GAPDH-Primern für 30 Zyklen amplifiziert und 10 μ l der PCR-Produkte mit einem 2% -igen Agarosegel analysiert (Abschnitt 2.2.8). MW: Molekulargewicht

Die RT-PCR mit phGPx-spezifischen Primern für die mitochondriale Form brachte in allen untersuchten Organen ein positives Ergebnis. Dabei zeigte der Hoden die intensivste Bande. In der Haut wurde nur eine sehr schwache Expression der mitochondrialen Form der phGPx nachgewiesen (Abb. 3.25 A). Im Gegensatz zur phGPx konnte das snGPx-Transkript nur im Hoden und in der Niere identifiziert werden. Neben der Bande für das snGPx-Transkript (527 bp) wurde eine zusätzliche Bande bei 740 bp detektiert (Abb. 3.25 B). Die Sequenzierung ergab ein unvollständig gespleißtes Transkript der snGPx, welches noch das Intron 1b enthielt. Alle weiteren Introns des ph/snGPx-Gens (Abb. 3.4 A) waren komplett herausgespleißt.

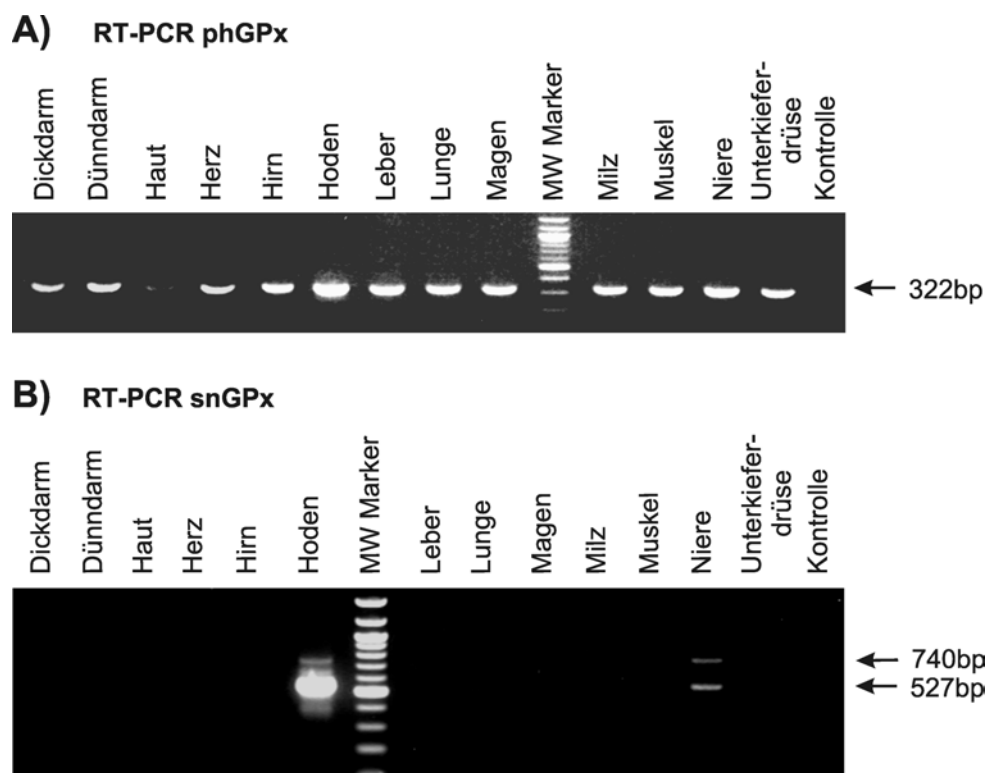


Abb. 3.25 RT-PCR mit sn/phGPx-spezifischen Primern

Nach der Präparation der Gesamt-RNA aus den einzelnen Geweben und Reverser Transkription wurden die entsprechenden RT-Produkte (2-3 µl) mit murinen phGPx- bzw. snGPx-spezifischen Primern für 35 Zyklen amplifiziert und 10 µl der PCR-Produkte mit einem 2% -igen Agarosegel analysiert (Abschnitt 2.2.8).

A) RT-PCR mit phGPx-spezifischen Primern für die mitochondriale Form. Das PCR-Produkt von 322 bp identifiziert die mitochondriale Form der phGPx.

B) RT-PCR mit snGPx-spezifischen Primern. Das PCR-Produkt von 527 bp zeigt das snGPx-Transkript an. Das entstandene PCR-Fragment von 740 bp repräsentiert eine unvollständig gespleißte Form der snGPx, die noch das Intron 1b enthält. MW: Molekulargewicht

Auch in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) konnten die Transkript für die snGPx und phGPx nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

3.5.2 Proteinchemische Untersuchungen der snGPx

Um die gewebespezifische Expression des ph/snGPx-Gens auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Immunoblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen die ph/snGPx durchgeführt. Für die Herstellung des monoklonalen Antikörpers wurde die im Baculovirus-System überexprimierte humane phGPx-Sec46Cys-Mutante für die zytosolische Form der phGPx genutzt (Schnurr *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Konservierung der phGPx zwischen den Spezies und der Sequenzübereinstimmung von phGPx und snGPx in einem weiten Bereich (Exon 2 - Exon 7) erkennt dieser Antikörper phGPx und snGPx von Mensch, Maus und Ratte.

Die einzelnen murinen Gewebe wurden homogenisiert, bei 20.000xg zentrifugiert und vom Überstand jeweils die gleiche Menge Protein in einem SDS-Acrylamidgel entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt (Abb. 3.26 A).

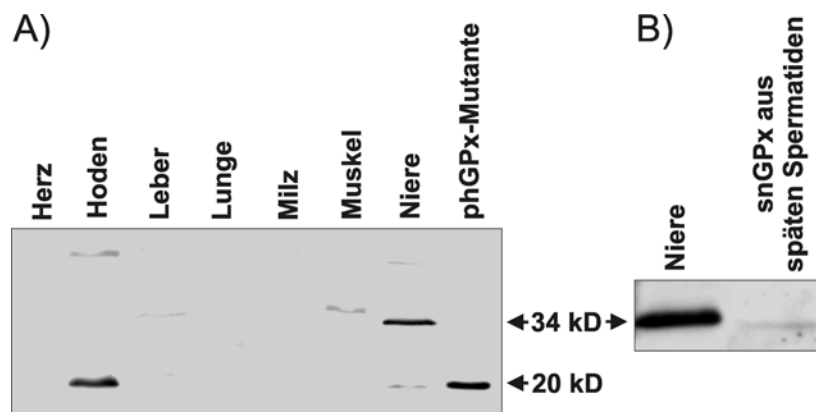


Abb. 3.26 Western Blot-Analyse muriner Gewebe

A) Die murinen Gewebe wurden in TBS-Puffer homogenisiert und bei 20.000 g zentrifugiert. Jeweils 50 µg des Proteinlysats (20.000xg Überstand) wurden in einem 12,5% -igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt, im semi-dry-Verfahren auf Nitrozellose geblottet und anschließend mit einem monoklonalen ph/snGPx-Antikörper behandelt und detektiert (Abschnitt 2.3.4, 2.3.5). Als Positivkontrolle diente 1 µg der gereinigten phGPx-Sec46Cys-Mutante.

B) Komigration der immunreaktiven Bande von 34 kD aus der Niere mit der snGPx aus den Kernen der späten Spermatiden des Menschen. Die Signale resultieren aus 50 µg Proteinlysats der murinen Niere (analog A) und 5 µg Proteinlysats aus den Kernen der späten Spermatiden des Menschen. Die humane snGPx wurde von der AG Prof. Behne zur Verfügung gestellt.

Im zytosolischen Lysat der Niere wurde eine deutliche immunreaktive Bande von 34 kD identifiziert. Die snGPx zeigte in der SDS-Elektrophorese ebenfalls diese Größe (Pfeifer *et al.*, 2001). In einem separaten Experiment (Abb. 3.26 B) konnte die Komigration der snGPx aus den Kernen der späten Spermatiden des Menschen mit dem immunreaktiven Protein aus der Niere gezeigt werden.

Die Immunreaktivität dieser Bande und die gleiche Größe mit der snGPx deuten auf eine starke Expression des snGPx-Proteins im Zytosol der Niere hin. Des weiteren wurde eine schwächere Bande bei 20 kD detektiert, die der Größe des phGPx-Proteins entspricht.

Im Hodenextrakt wurde eine deutlich immunreaktive Bande von 20 kD nachgewiesen, die der Größe des zytosolischen phGPx-Proteins entspricht. Im Gegensatz zur Niere dominiert die phGPx im Zytosol des Hodens. Die snGPx ist im zytosolischen Extrakt des Hodens nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage von Pfeifer *et al.* (2001), die das Protein in den Kernen der späten Spermatiden identifiziert haben.

Um die Funktionalität der detektierten snGPx in der Niere nachzuweisen, wurde eine Aktivitätsbestimmung des Enzyms durchgeführt. Da die snGPx ebenso wie die phGPx in der Lage ist Phospholipid-Hydroperoxide zu reduzieren, wurde ein gekoppelter optischer Test mit Phosphatidylcholin-Hydroperoxiden als Substrat durchgeführt (Abschnitt 2.3.7). Die Auswertung der spektrophotometrischen Daten ergab für die zytosolische Fraktion der Niere eine spezifische Aktivität von 0,057 U/mg Protein. Bereits früher durchgeführte Aktivitätsbestimmungen in der Niere liegen mit 0.028 U/mg in der gleichen Größenordnung (Cheng & Ross, 1997).

Weiterhin wurde eine Aufreinigung des immunreaktiven Proteins von 34 kD aus dem Zytosol der Niere durchgeführt. Dafür kam eine Mono-Q FPLC-Säule zum Einsatz. Da im Western Blot das Protein von 34 kD den größten Teil des immunreaktiven Materials darstellte, wurden anschließend die einzelnen Fraktionen mittels Dot-Blot Analyse getestet. Auf diese Weise konnte eine vierfache Anreicherung dieses Proteins erzielt werden, die jedoch mit einer deutlichen Inaktivierung einherging. Eine phGPx-Bande von 20 kD war nach der Aufreinigung nicht mehr nachweisbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der snGPx in der Niere stellt die Zweidimensionale (2D) Elektrophorese dar. Durch die Kopplung von Isoelektrischer Fokussierung (IF) und anschließender SDS-Elektrophorese ist eine Abtrennung von Proteinen zu erwarten, die in der einfachen SDS-Elektrophorese komigrieren (Abb. 3.27).

Für die immunreaktive Bande von 34 kD konnte ein isoelektrischer Punkt (IP) von ungefähr 7 bestimmt werden. Für die phGPx liegt der IP mehr im alkalischen Bereich (Ursini *et al.*, 1999). Eine Coomassie-Färbung des 2D-Gels zeigte keine deutliche Proteinfärbung in der Region der immunreaktiven Bande. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich nicht um ein Hauptprotein im Zytosol der Maus-Niere handelt.

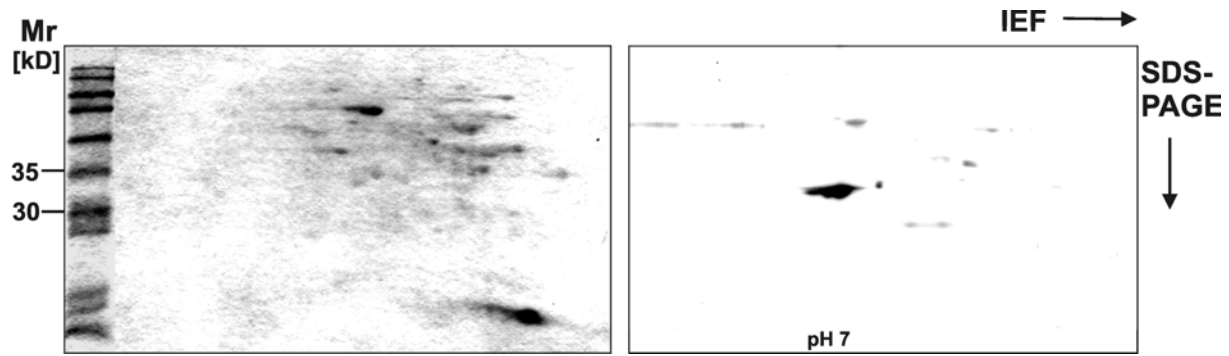


Abb. 3.27 2D-Elektrophorese der zytosolischen Proteine der Niere

Für die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) wurden 50 µg der zytosolischen Proteine der Niere eingesetzt. Nach anschließender Einbettung des IEF-Gels in das Sammelgel eines SDS-Gels erfolgte die Auftrennung entsprechend ihres Molekulargewichts (zweite Dimension) (Abschnitt 2.3.6). Die Coomassie-Färbung bzw. die Western Blot-Analyse erfolgten entsprechend der Abschnitte 2.3.4 und 2.3.5.

Sequenzierungsversuche (N-terminal, MALDI-MS) im Anschluß der 2D-Elektrophorese zur Identifizierung des immunreaktiven Spots schlugen fehl, da unter diesen Bedingungen die snGPx mit der Lactat-Dehydrogenase komigrierte und diese das dominante Protein darstellte. Im Western Blot zeigte dieses Protein keine Immunreaktivität mit dem monoklonalen ph/snGPx-Antikörper, welches eine Kreuzreaktivität ausschließt.

3.5.3 Intrazelluläre Lokalisierung der snGPx in der murinen Niere

Das Protein für die snGPx wurde bisher nur in den Kernen der späten Spermatiden identifiziert. Es konnte eine nukleäre Insertionssequenz nachgewiesen werden, die den Transport in den Kern ermöglicht (Pfeifer *et al.*, 2001). Um so überraschender war der Nachweis der snGPx im Zytosol der Maus-Niere. Die Western Blot-Analyse der Proteine aus dem Kern und dem Zytosol belegten in der Niere eine zytosolische Lokalisierung der snGPx. In den Kernen konnte dieses Protein nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.28).

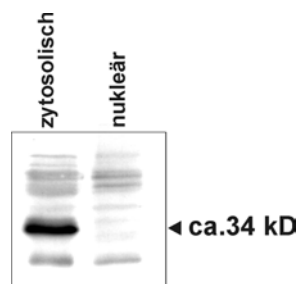


Abb. 3.28 Lokalisierung der snGPx in der murinen Niere

Die Präparation der zytosolischen und nukleären Extrakte aus der Maus-Niere sind im Abschnitt 2.3.3 beschrieben. 50 µg Protein des jeweiligen Extraktes wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse (Abschnitt 2.3.4 und 2.3.5) detektiert.

Genauere Untersuchungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung der snGPx sind mit immunohistochemischen Methoden möglich. Der zur Verfügung stehende monoklonale ph/snGPx-Antikörper unterscheidet nicht zwischen phGPx und snGPx. Im Western Blot konnte jedoch gezeigt werden, dass die snGPx von beiden das dominante Protein im Zytosol

der Niere darstellt. Damit sollten die mittels Immunohistochemie identifizierten Regionen die zelluläre und subzelluläre Verteilung der snGPx widerspiegeln.

Immunohistochemische Untersuchungen der Ratten- und Maus-Niere zeigten die Expression der snGPx in den interstitiellen Zellen der Nieren-Rinde und des Nieren-Markes (Abb. 3.29).

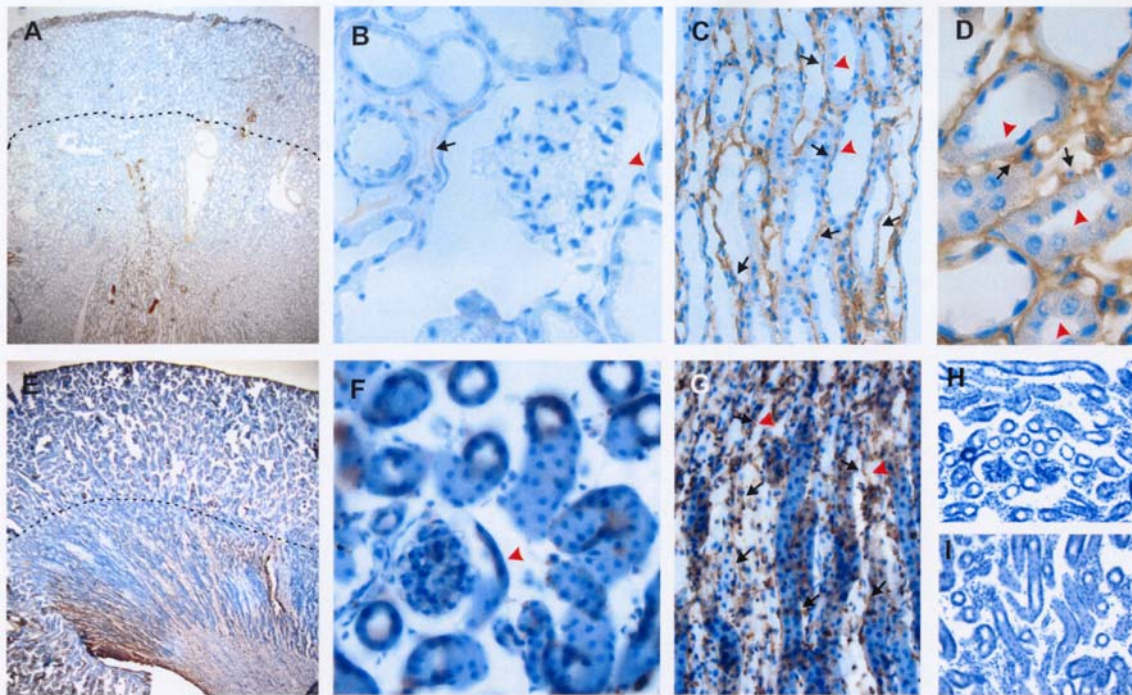


Abb. 3.29 Immunohistochemische Färbung der Nierenschnitte von Maus und Ratte

Nierenschnitte und immunohistochemische Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. N. Savaskan, Institut für Anatomie und Zellbiologie (Charité, Humboldt Universität zu Berlin) angefertigt.

Immunreaktive Färbungen stellen sich braun dar (schwarze Pfeile) und befinden sich in interstitiellen Zellen der Nierenrinde und des Nierenmarkes. Im Gegensatz dazu wurde in den Glomeruli und den Tubulus-Epithelzellen (rote Pfeile) keine ph/snGPx nachgewiesen.

A und E: Übersichten (A:Maus, E:Ratte) zeigen ph/snGPx-Verteilung, Vergrößerung 40 x

B und F: Immunnegative Glomeruli (B:Maus, F:Ratte), Vergrößerung 400 x

C, D und G: Immunreaktive Färbung im Nierenmark, Während die interstitiellen Zellen ph/snGPx-positiv sind (schwarze Pfeile), sind die Tubulus-Epithelzellen (rote Pfeile) immunnegativ. Vergrößerung 400 x für C und 1000 x für D

H und I: Nonimmunkontrolle der Maus-Niere (H:Glomerulus, I:Mark-Sammelrohre), Vergrößerung 100 x

Im Gegensatz dazu waren die Glomeruli, die Epithelzellen der Tubuli und der Sammelrohre frei von immunreaktiven Material. Diese Tatsache steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, die eine Expression der phGPx in Nieren-Epithelzellen nahe legten (Conz *et al.*, 1993). Aufgrund der größeren Dichte an interstitiellen Zellen im Nierenmark war die snGPx Expression in diesem Nierenabschnitt höher (Abb. 3.29 A und E).

Des weiteren wurde die intrazelluläre Verteilung der snGPx in Nieren-Rinde und Nieren-Mark mittels Immunelektronen-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.30).

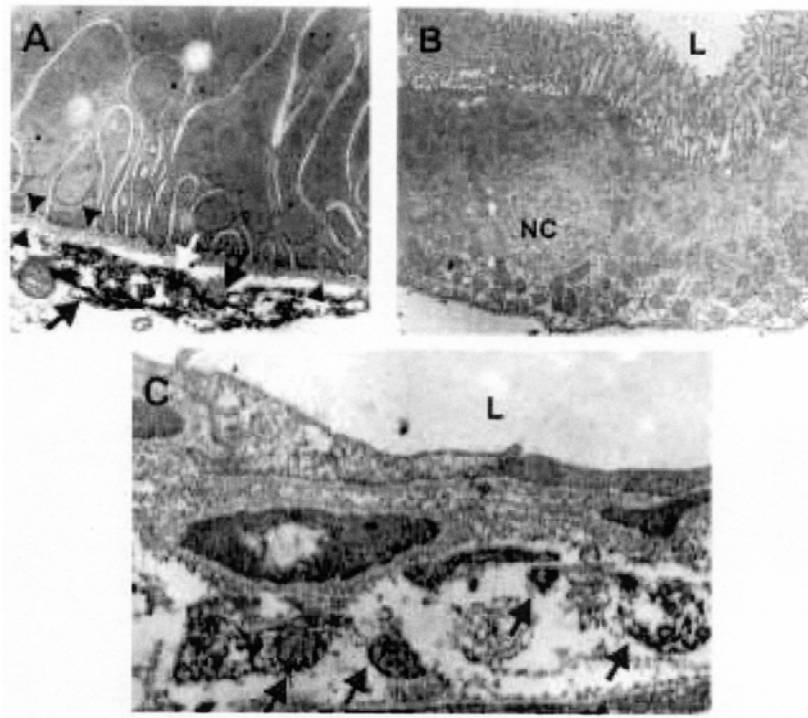


Abb.3.30 Immunelektronen-Mikroskopie muriner Nierenschnitte

Probenvorbereitung und Immunelektronen-Mikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. N. Savaskan, Institut für Anatomie und Zellbiologie (Charité, Humboldt Universität zu Berlin) durchgeführt.

- A: Distaler Tubulus: Das immunreaktive Material ist in einer interstitiellen Zelle (Pfeile) unterhalb der Basalmembran (Pfeilspitze) lokalisiert, Vergrößerung 12.000 x)
- B: Immunnegative Tubulus-Epithelzellen mit engen luminalen Spalten, Vergrößerung 7000 x
- C: Immunpositive Endothelzellen, Vergrößerung 20.000 x

Das Immunpräzipitat ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. L-Lumen; Nc-Kern

Die snGPx war überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, besonders unterhalb der Zellmembran interstitieller Nierenzellen (Abb. 3.30 A) sowie in vaskulären Endothelzellen (Abb. 3.30 C). Das tubuläre Epithel zeigt dagegen keine Immunreaktivität (Abb. 3.30 C).

4. DISKUSSION

4.1. Struktur und Transkriptionsvielfalt des ph/snGPx-Gens

Die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase (phGPx) ist eine ungewöhnliche Form unter den selenhaltigen Glutathion-Peroxidasen. Als einziges Mitglied dieser Familie ist sie in der Lage Hydroperoxygruppen in komplexen Esterlipiden (Phospholipide und Cholesterolester) zu reduzieren, auch wenn diese in Biomembranen oder Lipoproteinen eingebaut sind (Ursini & Bindoli, 1987; Thomas *et al.*, 1990; Sattler *et al.*, 1994). Außerdem wurde die phGPx im Zusammenhang mit der Spermatogenese (Nam *et al.*, 1998; Godeas *et al.*, 1997; Giannattasio *et al.*, 1997) und einer möglichen regulatorischen Bedeutung im Arachidonsäure-Stoffwechsel (Werz & Steinhilber, 1996; Schnurr *et al.*, 1996; Belkner *et al.*, 1998) diskutiert.

Obwohl die Entdeckung der phGPx auf das Jahr 1982 (Ursini, *et al.*, 1982) zurückgeht, wurde die Molekularbiologie dieser selenabhängigen Glutathion-Peroxidase viele Jahre lang nur wenig untersucht. Erst in den letzten Jahren kam es zu einem spürbaren Anstieg der Forschung auf diesem Gebiet. Neben den cDNA-Sequenzen der phGPx aus Schwein (Sunde *et al.*, 1993) Mensch (Esworthy *et al.*, 1994) und Ratte (Imai *et al.*, 1995; Pushpa-Rekha, *et al.*, 1995) war zu Beginn der Untersuchungen nur das phGPx-Gen vom Schwein bekannt. Für molekularbiologische Untersuchungen stellt das Mausmodell bzw. entsprechende Mauszelllinien ein leichter zugängliches System dar. Da zu diesem Zeitpunkt keine murinen Sequenzinformationen über die phGPx vorlagen, wurde zuerst die murine phGPx-cDNA aus einer Maus-Fibroblastenbank isoliert.

Ein Vergleich mit der parallel isolierten Maus-cDNA aus dem Hoden (Nam *et al.*, 1997) zeigte, dass es sich um die cDNA für die zytosolische Form der phGPx handelte (Abb. 4.1). Mit der cDNA aus dem Maus-Hoden wurde die mitochondriale Form der phGPx nachgewiesen, die zusätzlich eine entsprechende Insertionssequenz enthält (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995).

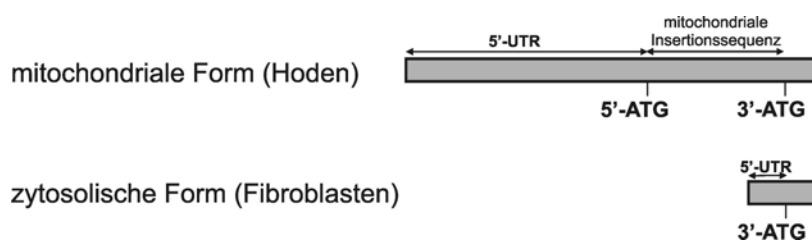


Abb. 4.1 Gegenüberstellung der unterschiedlichen Transkriptions- und Translationsstarts für die mitochondriale und zytosolische Form der phGPx

Mit Hilfe der isolierten cDNA der phGPx aus der Fibroblasten cDNA-Bank wurde das entsprechende murine phGPx-Gen identifiziert und kloniert (Borchert *et al.*, 1999).

Im Rahmen des Humanen Genom Projektes erfolgte die Strukturaufklärung des humanen phGPx-Gens (Kelner & Montoya, 1998). Besonders interessant war das theoretische Aufzeigen eines möglichen alternativen Exons 1 im Intron 1 des humanen phGPx-Gens mit einem weiteren potentiellen Startkodon. Eine anschließende Datenbanksuche nach Transkripten mit dem alternativen Exon 1 zeigte diese im Herz und im Darm (AA733049, AA587357). Den Beweis für die Richtigkeit der theoretischen Erkenntnisse lieferten 2001 Pfeifer *et al.* mit der Identifizierung des entsprechenden Proteins in den Kernen der späten Spermatiden des Ratten-Hodens (snGPx).

Da das bisherige phGPx-Gen für mittlerweile drei bekannte Transkripte kodiert (zytosolische und mitochondriale Form der phGPx und der kernlokalisierten snGPx) wird es in den Ausführungen ph/snGPx-Gen genannt.

Ein Vergleich der bekannten Sequenzen für die ph/snGPx-Gene von Mensch und Schwein mit dem klonierten und sequenzierten Maus-Gen zeigte die gleiche Exon/Intron-Struktur mit konservierten Exon/Intron-Übergängen. Es existieren 8 Exons und 7 Introns, wobei die alternative Nutzung des 5'- bzw. 3'-ATGs im Exon 1a oder des snATGs im Exon 1b den unterschiedlichen N-terminalen Bereich der entsprechenden Proteine definieren (Abb. 4.2). Die Exons 2-7 kodieren in allen drei Transkripten den weiteren Bereich des translatierten Proteins.

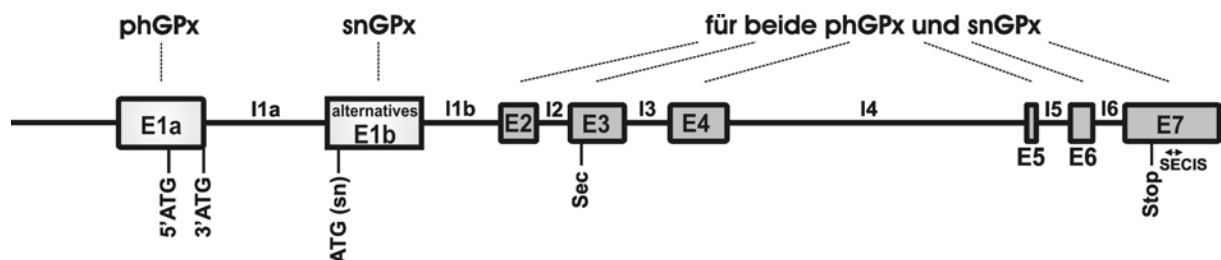


Abb. 4.2 Grundlegende Struktur des ph/snGPx-Gens

Das TGA-Kodon im Exon 3 kodiert für das katalytisch aktive Selenocystein, das für alle drei Proteine die Fähigkeit nahe legt, Hydroperoxy-Verbindungen zu reduzieren. Der normalerweise verursachte Abbruch der Translation durch ein TGA-Kodon, wird durch die im Exon 7 vorhandene Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) verhindert.

Die Exons 2-5 der einzelnen Spezies zeigen keine Längendifferenzen. Die Sequenzhomologien dieser Bereiche liegen bei über 90%. Auf der Aminosäureebene ist die Homologie zwischen den Spezies noch größer (Maus/Ratte 99%, Maus/Schwein 96%,

Maus/Mensch 94%). Die Konservierung der phGPx zwischen den einzelnen Spezies deutet auf eine entscheidende Rolle im Organismus hin (Knopp *et al.*, 1999). Große Sequenzunterschiede liegen jedoch in den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen.

Die Sequenzen der Introns sind erwartungsgemäß nicht so hoch konserviert. Auffällig ist hierbei das Intron 4 des murinen Gens, das deutlich größer ist als die der anderen Spezies (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Exon/Intron-Organisation der ph/snGPx-Gene von Maus, Schwein und Mensch

Strukturelement	Länge [bp]		
	Maus	Schwein	Mensch
Exon 1a	228	237	161
Intron 1a	333	512	608
Exon 1b	252	231	197
Intron 1b	399	227	254
Exon 2	95	95	95
Intron 2	91	77	86
Exon 3	145	145	145
Intron 3	123	124	147
Exon 4	152	152	152
Intron 4	804	86	433
Exon 5	25	25	25
Intron 5	92	153	133
Exon 6	60	60	60
Intron 6	86	69	80
Exon 7	269	252	240

Auf der Suche nach dem murinen ph/snGPx-Gen wurden zwei zusätzliche phGPx-positive Rekombinaten isoliert (Borchert *et al.*, 1999). PCR-Charakterisierung und Sequenzierung dieser Klone zeigten ausschließlich exonische Sequenzen der phGPx-cDNA. Das Fehlen der 5'-flankierenden Region und der Introns des ph/snGPx-Gens sowie die Anwesenheit von flankierenden repetitiven Elementen definieren diese Rekombinanten als prozessierte Pseudogene (Vanin, 1985; Rogers, 1985). Der genaue Sequenzvergleich mit der mitochondrialen Form der phGPx zeigte, dass es sich bei beiden Pseudogenen um die Retrotransposition eines Transkripts für die zytosolische (nicht-mitochondriale) Form der phGPx handelte. Diese Form wurde im Northern Blot in fast allen Geweben nachgewiesen und kann somit auch als Haushaltsgen bezeichnet werden. Viele der bis jetzt identifizierten Pseudogene sind aus Haushaltsgenen hervorgegangen (Wagner, 1986).

Die Mehrzahl der Retro-Pseudogene ist funktionslos. Es gibt jedoch einige Beispiele für funktionelle intronlose Gene (Chakrabarti *et al.*, 1995; Sorge *et al.*, 1990). Die genaue Sequenzanalyse des phGPx-Pseudogens 2 zeigte die für viele Pseudogene typischen multiplen

Mutationen (Punktmutationen, Insertionen und Deletionen). Die grundlegenden Veränderungen bedingen u.a. eine Verschiebung des Leserahmens bzw. einen vorzeitigen Abbruch der Translation durch ein Stoppkodon und machen somit die Bildung eines funktionellen Transkripts unmöglich. Dagegen weist das Pseudogen 1 nur zwei stumme Punktmutationen auf. Wesentliche Strukturmerkmale wie Einhaltung des Leserahmens oder die für das korrekte Lesen des TGA-Kodons notwendige Selenocystein-Insertionssequenz sind fehlerfrei vorhanden. Demnach können theoretisch vom Pseudogen 1 gebildete Transkripte zu einem funktionellen phGPx-Protein führen.

Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden in unserer Arbeitsgruppe fortführende Experimente unternommen (Boschan *et al.*, 2002). Mit funktionellen Promotorstudien konnte für das Pseudogen 1 eine geringe, jedoch signifikante Promotoraktivität in der 5'-flankierenden Region nachgewiesen werden, die neben der erhaltenen Aminosäuresequenz der phGPx einen weiteren Hinweis für eine mögliche Expression darstellt. Da eine Unterscheidung der beiden phGPx-Formen auf Proteinebene nicht möglich ist, wurde der Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene durchgeführt. Durch eine der Punktmutationen war ein Restriktionsort verloren gegangen, der im paralogen phGPx-Transkript vorhanden ist. Eine Kombination von RT-PCR und Restriktionsanalyse ermöglichten den Expressionsnachweis des Pseudogens 1.

Auch für das Pseudogen 2 wurde eine Kombination von RT-PCR und Restriktionsanalyse durchgeführt. Es konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden (Boschan *et al.*, 2002).

Seit der Retrotransposition der phGPx-cDNA in das Genom der Maus haben sich die beiden identifizierten Pseudogene sehr unterschiedlich entwickelt. Die Mechanismen, die diesen Vorgang kontrollieren, werden bis heute jedoch nur sehr wenig verstanden (Mihell *et al.*, 2000). Beide identifizierten phGPx-Pseudogene unterscheiden sich deutlich in ihrer Primärstruktur. Grundlegend können zwei Erklärungsmöglichkeiten für die strukturellen Unterschiede herangezogen werden.

- i) Zum einen könnte die Retrotransposition der phGPx-Transkripte in das murine Genom zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattgefunden haben. Unter der Annahme, dass beide Pseudogene unter dem gleichen niedrigen evolutionären Druck stehen, wäre das Pseudogen 1 der phGPx als evolutionär sehr jung einzustufen. Aufgrund der vielen Sequenzänderungen des phGPx-Pseudogens 2 wäre deren Retrotransposition an einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung anzusiedeln.
- ii) Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für die Unterschiede zwischen den phGPx-Pseudogenen geht von der Annahme aus, dass beide unter unterschiedlichem evolutionären Druck

stehen. Für das Pseudogen 1 wurde die Bildung der mRNA nachgewiesen und die Translation des entsprechenden Proteins ist prinzipiell möglich. Es könnte unter einem höheren evolutionären Druck stehen als das Pseudogen 2, das zahlreiche Veränderungen seit der Retrotransposition ins Genom erfahren hat.

Um einen ungefähren Einblick über den Zeitpunkt der Retrotransposition des Pseudogens 1 ins Genom zu erhalten, wurde die genomische DNA von zwei Mausarten untersucht, die sich in ihrer Entwicklung zu separaten Arten vor ca. 3 Millionen Jahren trennten (Abb. 4.3).

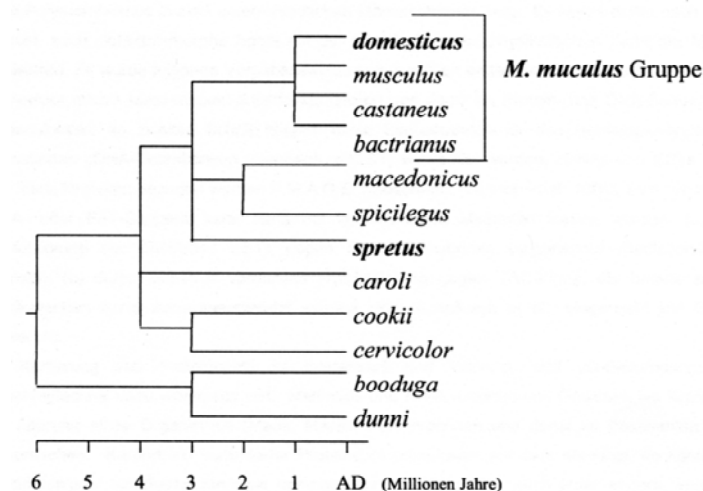


Abb. 4.3 Ein Stammbaum der Gattung *Mus* nach Silver (Silver, 1995).

Mus musculus und *Mus spretus* trennten sich in ihrer Entwicklung zu separaten Arten vor ca. 3 Millionen Jahren.

Im Genom beider Mausarten ließ sich das Pseudogen 1 nachweisen. Die Retrotransposition der phGPx-mRNA ins Genom sollte für das untersuchte Pseudogen 1 schon mehr als 3 Millionen Jahre zurückliegen und kann demnach nicht mehr als evolutionär junges Ereignis angesehen werden. Die hohe Konservierung der Sequenz, die eine Funktionalität ermöglicht, ist somit eher mit einem hohen evolutionären Druck zu erklären.

Der Einbau der Pseudogene ins Genom kann prinzipiell überall erfolgen. Pseudogene, die durch Gendublikation entstanden sind, wurden vielfach in unmittelbarer Nähe des entsprechenden funktionellen Gens nachgewiesen. Die hohe Sequenzähnlichkeit und die enge Nachbarschaft stellen eine gute Basis für eine genomische Umorganisation dar, die evolutionär große Bedeutung besitzt (Pretsch *et al.*, 1998). Prozessierte Pseudogene treten oft gehäuft an einem gemeinsamen Ort im Genom auf (Sadhu *et al.*, 1997; Liu & Chan, 1990). Zudem wurden viele Pseudogene in zentralen Bereichen der Chromosomen identifiziert (Harrison *et al.*, 2002).

Die genaue Untersuchung der phGPx-Pseudogene hinsichtlich ihrer Positionen im murinen Genom zeigte die Lokalisierung auf zwei verschiedenen Chromosomen. Das funktionelle Pseudogen 1 wurde im mittleren Abschnitt des Chromosoms 10 identifiziert.

Interessanter Weise befindet sich auch das funktionelle ph/snGPx-Gen auf diesem Chromosom (Knopp *et al.*, 1999). Die Bestimmung der gegenseitigen Positionen zeigte die Lokalisierung des Pseudogens 1 im Abschnitt B und des ph/snGPx-Gens im Abschnitt C des Chromosoms 10.

Der Nachweis eines transkribierten phGPx-Pseudogens und die gemeinsame Lokalisierung auf dem Chromosom 10 ist besonders für zukünftige Knockoutversuche des funktionellen ph/snGPx-Gens von Bedeutung. Da das Transkript des Pseudogens 1 in vielen Geweben nachgewiesen werden konnte, ist eine gewisse Kompensierung der ausgeschalteten phGPx denkbar.

4.2. Die Bindung von positiv und negativ regulatorischen Proteinen im ph/snGPx-Gen

Die Regulation der Genexpression kann auf der Ebene der Transkription, der RNA-Prozessierung und -Stabilität sowie des RNA-Transports vom Zellkern in das Zytoplasma erfolgen. Ebenso ist eine Kontrolle auf der Ebene der Translation möglich.

Durch alternative RNA-Synthese bzw. -Prozessierung entstehen verschiedene mRNA-Transkripte von einem Gen, wodurch eine effiziente Nutzung des genetischen Materials möglich wird. Grundlegend können diese Transkripte durch unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte aber auch durch die Nutzung von alternativen Exons (alternatives Spleißen) definiert werden (Goldstrohm *et al.*, 2001).

Das isolierte ph/snGPx-Gen kodiert durch die alternative Nutzung der Exons 1a und 1b für nunmehr drei N-terminal verschiedene Proteine, der zytosolischen und mitochondrialen Form der phGPx sowie der kernlokalisierten snGPx. Die Expression des ph/snGPx-Gens ist gewebespezifisch reguliert. Während die phGPx in unterschiedlichen Mengen in vielen Zellen und Geweben exprimiert wird (Brigelius-Flohé, 1999), wurde die snGPx bisher nur in den Kernen der späten Spermatiden nachgewiesen (Pfeifer *et al.*, 2001).

In der Sequenz des murinen ph/snGPx-Gens einschließlich der angrenzenden 5'- und 3'-flankierenden Regionen können wichtige regulatorische und strukturelle Informationen gespeichert sein, deren Untersuchung Aufschlüsse über die Expressionsregulation des Gens bringen kann. So steht die Frage, ob die differenzierte Bildung der einzelnen mRNAs auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene erfolgt.

Um der Klärung dieser Frage näher zu kommen, wurden funktionelle Promotorstudien mit verschiedenen Sequenzabschnitten der 5'-flankierenden Regionen des Exons 1a für die phGPx Formen und des Exons 1b für die snGPx durchgeführt. Erfolgt die Unterscheidung auf transkriptioneller Ebene, sollte für jedes Transkript eine minimale separate Promotorregion mit unterschiedlichen funktionellen cis-regulatorischen Bereichen für trans-aktivierende Faktoren vorhanden sein. Die potentiellen Promotorregionen wurden mit dem MatInspector untersucht. Dieses Programm stützt seine Auswertung auf eine Datenbank mit derzeit bekannten Transkriptionsfaktoren und deren Bindungssequenzen und -motiven.

Als erstes wurde die 5'-flankierende Region und das Exon 1a des ph/snGPx-Gens untersucht. In dieser Region sollten die wesentlichen trans-regulatorischen Faktoren binden, die für eine Transkription der mitochondrialen (5'-ATG) und/oder der zytosolischen Form (3'-ATG) der phGPx verantwortlich sind. Mit Hilfe des MatInspector-Programms konnten mehrere theoretisch bindende Faktoren identifiziert werden (Abb. 4.4).

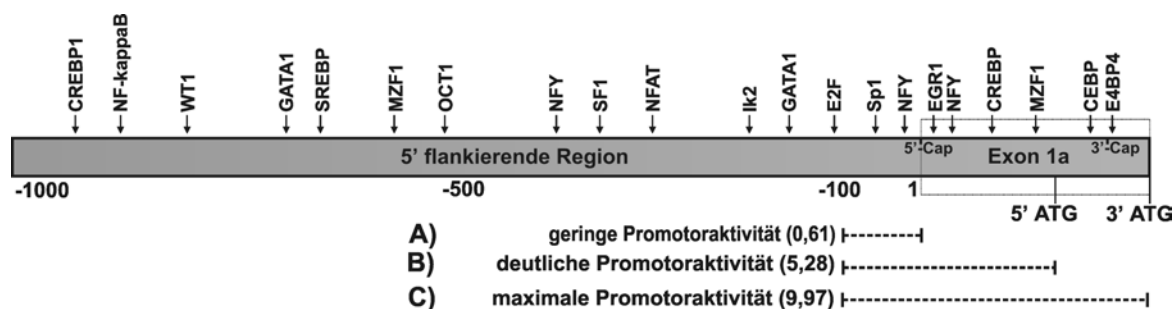


Abb. 4.4 Theoretisch bindende Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden Region und im Exon 1a des ph/snGPx-Gens

A-C) Sequenzbereiche, die im Promotorassay die höchste Aktivität in der jeweiligen Gruppe (Abb. 3.13) von Promotorkonstrukten zeigten. In Klammern steht die relative Promotoraktivität bezogen auf einen starken Promotor (Abschnitt 2.2.4).

Es wurden nur die Transkriptionsfaktoren dargestellt, die eine hohe Homologie zu den in der Transfac-Datenbank enthaltenen Konsensus-Bindungsmotiven aufweisen.

Während die meisten untersuchten Promotoren eine positionskonservierte TATA-Box besitzen, zählt das ph/snGPx-Gen zu den TATA-loosen Genen. Dafür sind zwei potentielle CCAAT-Boxen vorhanden, an denen der Nukleäre Faktor-Y (NF-Y) binden kann. Bei Promotoren ohne TATA-Box spielt sehr oft die CCAAT-Box eine entscheidende Rolle für die Transkription des Gens (Mantovani *et al.*, 1992; Liberati & Ronchi, 1998).

Um die unterschiedlichen potentiell regulatorischen Regionen für die zytosolische (stromaufwärts des 3'-ATG) und mitochondriale Form (stromaufwärts des 5'-ATG) der phGPx zu

berücksichtigen, wurden Promotorkonstrukte mit unterschiedlichen 3'-Enden hergestellt (Abb. 4.4).

Die Promotorstudien zeigten eine deutliche Promotoraktivität unter Einbeziehung der 5'-UTR für die mitochondriale Form der phGPx (Abb. 4.4, B). Diese Tatsache belegt das Vorhandensein wichtiger cis-regulatorischer Elemente in diesem Abschnitt.

Unter Einbeziehung der Region zwischen den beiden potentiellen Startkodons (Abb. 4.4, C), die für die mitochondriale Insertionssequenz kodiert, konnte ein weiterer Anstieg der Promotoraktivität beobachtet werden. Da diese Sequenz für die zytosolische Form der phGPx die untranslatierte Region darstellt, ist das Binden von regulatorischen Proteinen für die Transkription dieser Form der phGPx denkbar.

Promotorkonstrukte, die nur die 5'-flankierende Region des Exons 1a enthielten (Abb. 4.4, Gruppe A), zeigten kaum Promotoraktivität. Diese Region kann demnach nicht eigenständig für die Expression der phGPx verantwortlich sein.

Die Untersuchung der potentiellen Promotorregion des humanen Gens zeigten eine deutliche Promotoraktivität in den ersten 300 bp ausgehend vom 5'-ATG für die mitochondriale Form der phGPx, wobei im Gegensatz zum murinen Gen der Einfluß der 5'-UTR dieser Form nur sehr gering war (Huang *et al.*, 1999). Mutagenesestudien und Gelshiftexperimente zeigten, dass der an der CCAAT-Box (-156 bis -151bp) bindende Transkriptionsfaktor NF-Y essentiell für die Expression der phGPx ist. Der Sequenzvergleich zwischen dem humanen und murinen ph/snGPx-Gen ergab, dass diese CCAAT-Box in der 5'-flankierenden Region des Gens zwischen den Spezies konserviert ist. Die Promotorstudien am murinen Gen zeigen jedoch deutlich, dass diese allein nicht für eine deutliche Promotoraktivität des murinen Gens ausreichend ist.

Die maximale Promotoraktivität der untersuchten Region (-1000 bp bis +228 bp) wurde im Exon 1a nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Einbeziehung der Sequenzen für die mitochondriale Insertionssequenz einen deutlichen positiven Effekt auf die Promotoraktivität besitzen. Da dieser Sequenzabschnitt die kodierende Region für die mitochondriale Form der phGPx (5'-ATG) darstellt, ist dieser Sequenzabschnitt als minimaler Promotor für die zytosolische Form (3'-ATG) denkbar. Durch die Promotorstudien dieser Region ist also eine separate Transkription der mitochondrialen und zytosolischen Form der phGPx nicht auszuschließen. Dies unterstützt die Ergebnisse von Pushpa-Rekha *et al.*, 1995, die zwei unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte für die beiden Formen der phGPx in der isolierten cDNA der Ratte nachgewiesen haben.

Bei eukaryotischen Genen wurden transkriptionell regulatorische Elemente nicht nur in ihrer 5'-flankierenden Region gefunden, sondern auch in ihren Introns (Sarkar *et al.*, 1991; Kallunki *et al.*, 1995). Diese Sequenzen können als Aktivatoren wirken (Jallat *et al.*, 1990) oder sind für eine entsprechende gewebe- oder zellspezifische Expression erforderlich (Belecky-Adams *et al.*, 1993).

Die 5'-flankierende Region des (sn)ATGs stellt die potentielle Promotorregion für die Bildung des kernlokalisierten Transkripts (snGPx) dar. Auch hier ergab die theoretische Untersuchung der Sequenzen mit dem MatInspector-Programm deutliche Hinweise auf das Vorhandensein von cis-regulatorischen Elementen (Abb. 4.5).

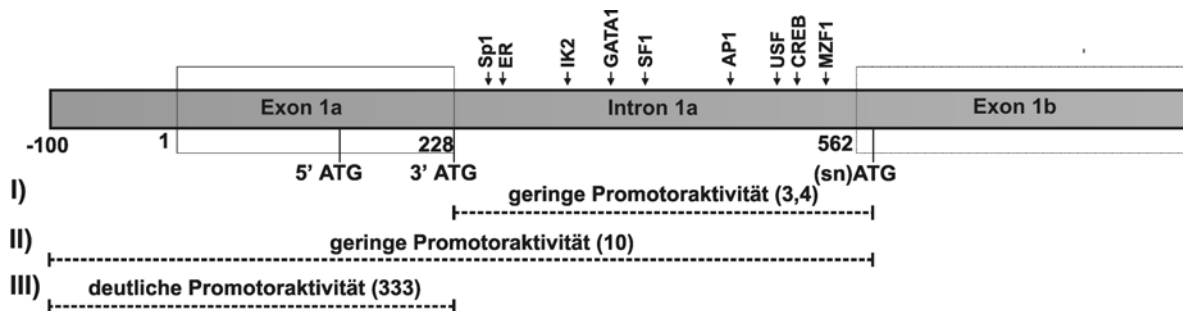


Abb. 4.5 Theoretisch bindende Transkriptionsfaktoren in der 5'-flankierenden Region (Intron 1a) des potentiellen Startkodons für die snGPx

I-III) Im Promotorassay untersuchten Sequenzabschnitte mit den dazugehörigen Promotoraktivitäten (Abb. 3.14)

In der 5'-flankierenden Region (Intron 1a) des Exon 1b der snGPx konnte nur eine sehr geringe Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.5, I). Eine Regulation der gewebe- und zellspezifischen Genexpression über separate alternative phGPx/snGPx-Promotoren konnte in diesem Zellsystem somit nicht belegt werden. Die Transkription der einzelnen Formen scheint von einer gemeinsamen Promotorregion vor dem phGPx 3'-ATG reguliert zu werden. Interessanter Weise wird die Promotoraktivität dieser gemeinsamen Region durch die Einbeziehung der intronischen Sequenzen des Introns 1a stark beeinträchtigt (Abb. 4.5, II/III). Es ist denkbar, dass im Intron 1a des ph/snGPx-Gens Proteine binden, die mit den funktionellen Transkriptionsfaktoren der 5'-flankierenden Region wechselwirken und dadurch zu einer deutlichen Herabsetzung der Promotoraktivität führen.

Sowohl der positive als auch negative Einfluss von intronischen Elementen auf die zellspezifische Expression von Genen wurde des öfteren gezeigt (Zabel *et al.*, 2000; Oskouian *et al.*, 1997). Es sind Gene bekannt, die im ersten Intron cis-regulatorische Elemente aufweisen, die direkt die Initiation der Transkription von der 5'-Promotorseite beeinflussen. So konnten im Intron 1 des Maus Ha-ras Gens fünf Footprintregionen nachgewiesen werden, von denen zwei aktivierend und eine negativ regulatorisch wirken (Telliez *et al.*, 1995). Das

Drosophila Tropomyosin I-Gen steht unter der Kontrolle von mindestens zwei regulatorischen Regionen des ersten Introns (Gremke *et al.*, 1993).

4.3. Funktionelle cis-regulatorische Elemente im Intron 1a und im Exon 1b des ph/snGPx-Gens

Der negativ regulatorische Einfluss der Intron 1a - Sequenzen auf die Promotoraktivität der potentiellen Promotorregion für die Expression der phGPx ergab den Anlass, nach DNA/Protein-Interaktionen im Intron 1a zu suchen. Als Quelle für Kernproteine dienten HEK293 Zellen, da in diesen Zellen die Promotorstudien durchgeführt und die Transkripte für die phGPx und snGPx nachgewiesen wurden. Die untersuchten Intronsequenzen stammen aus dem murinen ph/snGPx-Gen, so dass auch murine Kernproteine eingesetzt werden sollte. Durch die hohe Konservierung des Gens zwischen den Spezies ist eine grundlegend ähnliche Transkriptionsregulation zu erwarten. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war der Hoden das einzige Organ, in dem neben der phGPx auch die snGPx nachgewiesen wurde.

Mit den eingesetzten Kernproteinen konnten im DNase-I-*in vitro*-Footprint fünf Protein-bindende Regionen im Intron 1a identifiziert werden. Die Einbeziehung von 3'-angrenzenden Sequenzen des Exons 1b ergab eine weitere, durch Proteinbindung geschützte Region (Abb. 4.6). Die nukleären Extrakte der HEK293 Zellen und des murinen Hodens zeigten im DNase-I-Footprint Assay keine deutlichen Unterschiede.

Die Identifizierung der im Intron 1a bindenden Proteine erfolgte im Gelshift Assay. Mit Hilfe von Konsensus-Oligonukleotiden für bekannte Transkriptionsfaktoren bzw. deren Familien und spezifischen Antikörpern konnte die Bindung folgender Proteine nachgewiesen werden:

- SP1 (Stimulierendes Protein 1),
- Proteine der EGR-Familie (early growth response gene 1 - EGR1 und Wilms Tumor Suppressor - WT1),
- Proteine der GATA-Familie (GATA - bindende Proteine),
- SREBP1 (Sterol responsables Element-bindendes Protein 1),
- USF1 (upstream stimulating factor 1) der E-BOX-bindenden Proteine,
- Proteine der CREB-Familie (cAMP responsables Element-bindende Proteine).

Durch Chromatin Immunopräzipitation mit einem polyklonalen SREBP1- und EGR1-Antikörper konnte die Bindung dieser Faktoren auch *in vivo* belegt werden.

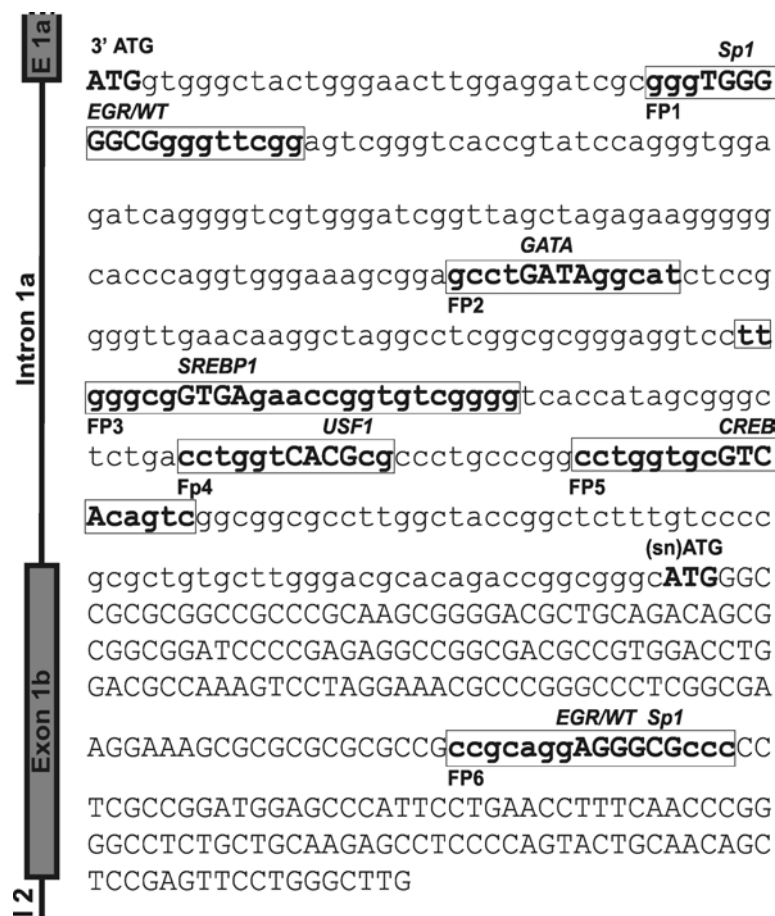


Abb. 4.6 Identifizierte cis-regulatorische Elemente für trans-aktivierende Faktoren im Intron 1a des ph/snGPx-Gens

Im Footprint Assay identifizierte Regionen sind durch fettgedruckte und eingerahmte Sequenzen hervorgehoben. Die nachgewiesenen DNA-bindenden Proteine bzw. Proteinfamilien sind kursiv gedruckt und über den eingrahmten Sequenzen gekennzeichnet. Die Kernbindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren sind mit Großbuchstaben hervorgehoben. Das 3'-ATG ist der Translationsstart für die zytosolische Form der phGPx und das (sn)ATG für die kernlokalisierte, zuerst in den späten Spermatiden identifizierte snGPx.

Bereits erwähnte Beispiele belegen den Einfluss intronischer cis-regulatorischer Elemente auf die zellspezifische Expression von Genen. Der genaue Mechanismus ist dabei jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es gibt verschiedene Theorien über die Wirkungsweise intronischer Sequenzen auf die Transkription von Genen.

- i) So ist es z.B. möglich, dass durch die Bindung von Proteinen an intronischen Sequenzen die Elongation der Transkription geblockt werden kann (Huang & Gallo, 1997; Spencer & Groudine, 1990). Die Bildung des entsprechenden Transkripts wäre somit stark beeinträchtigt. Bei der alternativen Transkription eines Gens könnte dieser Mechanismus eine Entscheidung über die bevorzugte Expression eines speziellen Transkripts bringen. Eine weitere Folge könnte die Beeinträchtigung der RNA-Prozessierung sein, da Transkription

und RNA-Prozessierung nicht losgelöst voneinander stattfinden. Es ist denkbar, dass unter solchen Bedingungen die Wahl von alternativen Spleißorten reguliert werden könnte.

- ii) Die an intronischen Sequenzen gebundenen Proteine können durch direkte Wechselwirkung mit dem 5'-flankierenden Promotor als Silencer der Transkription wirken. Die Interaktion über einen größeren Sequenzabschnitt hinweg ist durch die Bildung eines DNA-Loops denkbar (Ptashne, 1986). So könnte durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an intronischen Elementen direkt in die Bildung des Transkriptionskomplexes eingegriffen und/oder die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren behindert aber auch gefördert werden.

Die selektive Expression der relevanten DNA-bindenden Proteine in den entsprechenden Zellen bzw. deren Menge könnte somit die Entscheidung über die alternative Expression von phGPx und snGPx treffen. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Bindung von trans-regulatorischen Proteinen im Intron 1a des ph/snGPx-Gens bilden die Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Transkriptionsregulation. Für die Expression der snGPx konnte in dem eingesetzten Zellsystem kein distinkter Promotor nachgewiesen werden. Die Bindung von trans-regulatorischen Proteinen an den identifizierten funktionellen cis-regulatorischen Elementen in der 5'-flankierenden Region des Exons 1b führen somit nicht unmittelbar zur Bildung der snGPx.

Auch im Exon 1b konnte eine DNA-bindende Region mit den dazugehörigen Proteinen identifiziert werden. Die RT-PCR von snGPx-Transkripten (Abb. 3.25) zeigte die Anwesenheit eines unvollständig gespleißten Transkripts, welches noch das Intron 1b enthält. Die Introns 2-6 waren komplett herausgespleißt. Das Intron 1b wird demnach verzögert gespleißt. Da DNA-bindende Transkriptionsfaktoren auch in der Lage sein können an einsträngiger RNA zu binden, ist eine Beteiligung der identifizierten Transkriptionsfaktoren am Spleißprozess nicht auszuschließen (Zhai *et al.*, 2001; Draper, 1999). Alternative Exons besitzen oft suboptimale Spleißseiten. Die effektive Nutzung dieser Exons erfordert die zusätzliche Beteiligung von Hilfsproteinen (Spleiß-Enhancer/Silencer) (Gee *et al.*, 2000). Cis-regulatorische prä-mRNA Sequenzen, die trans-aktivierende Spleißfaktoren binden, können im alternativen Exon (Liu *et al.*, 1998), in den flankierenden Introns (Modafferi & Black, 1997; Ashiya & Grabowski, 1997) und auch in den angrenzenden Exons liegen (Tsukahara *et al.*, 1994). Die Identifizierung von funktionellen Protein-Bindungsregionen im Intron 1a und im angrenzenden Exon 1b schließt die Bildung der snGPx aus einer gemeinsamen ph/snGPx-prä-mRNA durch alternatives Spleißen nicht aus. Es ist denkbar, dass durch die Bindung von trans-regulatorischen Proteinen an den Sequenzen des Introns 1a eine Sekundärstruktur er-

zeugt wird, die neben einer Promotoraktivierung auch die Wahl von alternativen Spleißorten vermittelt.

DNase-I-*in vitro*-Footprint, Gelshift Assay und Chromatin Immunopräzipitation wurden für den Nachweis von Proteinen eingesetzt, die an Sequenzen des Introns 1a und des Exons 1b (snGPx) binden. Dabei war das Hauptaugenmerk auf die Identifizierung dieser Faktoren gerichtet. Neben den *in vitro*-Experimenten konnte auch die Relevanz ausgesuchter trans-regulatorischer Proteine *in vivo* belegt werden. Im folgenden Abschnitt werden wichtige Eigenschaften der identifizierten Faktoren mit einem möglichen Einfluss auf die Transkriptionsregulation des ph/snGPx-Gens und deren Zusammenwirken diskutiert.

GC-BOX bindende Transkriptionsfaktoren der SP-Familie (*stimulating protein*) und der EGR-Familie (*early growth response*)

In den untersuchten Sequenzabschnitten (Intron 1a und Exon 1b) des ph/snGPx-Gens wurden zwei cis-regulatorische Elemente identifiziert, die eine überlappende Bindungssequenz für die Transkriptionsfaktoren der SP-Familie und der EGR-Familie besitzen (Abb. 4.6). Dabei handelt es sich um GC-reiche Sequenzen, die durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren die Expression zahlreicher Gene regulieren (Suske G, 1999).

Im Intron 1a des ph/snGPx-Gens wurde ein GC-reiches cis-regulatorisches Element identifiziert, an dem die trans-regulatorischen Faktoren SP1 und EGR1 binden können (Abb. 4.6). Mit den Kernproteinen der HEK293 Zellen und der murinen Niere konnte das gleichzeitige Binden beider Faktoren gezeigt werden, wobei SP1 das dominant bindende Protein darstellte. Mit dem nukleären Extrakt des murinen Hodens wurde nur die Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 beobachtet. An dem überlappenden SP1/EGR1 cis-regulatorischen Element ist somit potentiell die Bindung beider Faktoren möglich. Die Expressionsintensität bzw. das Verhältnis der jeweiligen Faktoren zueinander könnte somit die Transkription des ph/snGPx-Gens beeinflussen.

Der Transkriptionsfaktor SP1 zählt zur SP-Familie, die durch eine C-terminale DNA-Bindungsdomäne mit drei Zinkfingermotiven vom Typ C2H2 charakterisiert sind. Gegenwärtig werden dieser Familie vier Proteine (SP1-4) zugeordnet (G. Suske, 1999). SP1, SP3 und SP4 erkennen die gleiche GC-reiche Bindungssequenz (Hagen *et al.*, 1992 und 1994). Aufgrund des Austausches von Histidin gegen Leucin innerhalb des ersten Zinkfingers erkennt SP2 eine GT-reiche Bindungssequenz (Kingsley & Winoto, 1992). Die bisher bekannten funktionellen Eigenschaften der einzelnen Vertreter der SP-Familie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung bzw. ihrer Wirkungsweise. Die Unterscheidung von

SP1 und SP3 gestaltet sich jedoch schwierig, da die Expression der Faktoren und ihr DNA-Bindungsverhalten sehr ähnlich sind. Beide Gene werden in zahlreichen Zelltypen und Geweben exprimiert und SP1-Knockout Versuche deuten auf eine mögliche Kompensation des fehlenden Proteins durch SP3 hin (Suske G, 1999).

Die Tatsache, dass viele Promotoren über ein oder mehrere SP1-Bindungsstelle verfügen, spricht für eine grundlegende Bedeutung in der Transkriptionsregulation (Kadonaga *et al.*, 1987). So interagiert SP1 mit dem basalen Transkriptionsapparat durch die Bindung mit basalen Transkriptionsfaktoren (TFIIB, TBP) und/oder mit Koaktivatoren wie TAF 55, TAF 135 und CRSP (Emili *et al.*, 1994; Chiang & Roeder, 1995; Mengus *et al.*, 1997; Ryu *et al.*, 1999). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass zahlreiche regulatorische DNA-bindende Faktoren mit SP1 wechselwirken, z.B. das Retinoblastom Protein (Noe *et al.*, 1998), das Tumorsuppressorprotein p53 (Borellini & Glazer, 1993) sowie zahlreiche Transkriptionsfaktoren u.a. E2F, GATA1 und SREBP1 (Karlseder *et al.*, 1996; Merika & Orkin, 1995; Shimano, 2001).

Der Transkriptionsfaktor EGR1 gehört im Gegensatz zu SP1 nicht zu den ubiquitär exprimierten DNA-bindenden Proteinen. Als Mitglied der EGR-Familie (EGR1-4 und WT1) zählt es zu den Zink-Finger Transkriptionsfaktoren und kann durch zahlreiche Umgebungs-signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine und Veränderungen im Redox-Status induziert und reguliert werden (Gashler & Sukhatme, 1995; Adamson & Mercola, 2002; Thiel & Cibelli, 2002).

Untersuchungen von Hallahan *et al.*, 1995 und Huang *et al.*, 1998 belegen einen zellschützenden Einfluss von EGR1 unter Bedingungen des oxidativen Stress, z.B. durch UV-Strahlung und radioaktive Belastung. Unter den vielfältigen Beispielen für Gene, die potentielle Bindungsstelle für das trans-regulatorische Protein EGR1 besitzen (Adamson & Mercola, 2002), sind also auch Gene des Peroxidstoffwechsels denkbar.

Aufgrund der bisher bekannten Funktionen des ph/snGPx-Gens im Peroxidstoffwechsel ist demnach der Einfluss des identifizierten überlappenden SP1/EGR1-Bindungsstellen auf eine Expressionsregulation des Gens unter oxidativen Stress prinzipiell möglich.

Im Gelshift konnte das potentielle Binden von SP1 und EGR1 gezeigt werden, wobei SP1 das dominante Protein darstellte. Aus der Literatur sind zahlreiche Gene bekannt, die eine überlappende SP1/EGR1-Konsensus-Bindungssequenz besitzen (Silverman & Collins, 1999). Unter normalen Bedingungen wurde meistens die Bindung von SP1 nachgewiesen, die für eine basale Expression des Gens erforderlich ist. Stimulierung durch äußere Stresseinflüsse (H₂O₂, UV- und radioaktive Strahlung, Hypoxie, Arsenit) induzierten die EGR1-Expression

mit der Konsequenz, dass die SP1-Bindung zurückgedrängt wurde und die Bindung von EGR1 an der überlappenden SP1/EGR1 konsensus Bindungssequenz erfolgte (Khachigian *et al.*, 1996). Häufig war eine Steigerung in der Expression des entsprechenden Gens zu beobachten.

Eine erhöhte Expression des ph/snGPx-Gens unter Bedingungen des oxidativen Stress würde eine relevante Antwort zum Zellschutz sowohl in der Zelle als auch im Zellkern darstellen.

In den exonischen Sequenzen des Exon 1b konnte ebenfalls ein funktionelles cis-regulatorisches Element mit einer überlappenden SP1/EGR Konsensus-Bindungssequenz nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Die Gelshiftexperimente belegen die Bindung der Transkriptionsfaktoren SP1 und WT1.

Das Wilms Tumor Gen 1 hat die Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens, d.h. es konnte bisher bei zahlreichen kanzerogenen Erkrankungen identifiziert werden, die auf Mutationen bzw. Deletionen im WT1-Gen zurückgehen, z.B. Wilms Tumor oder Leukämie (Englert, 1998). Die Struktur des Proteins ähnelt durch die Ausbildung von vier Zink-Fingern vielen Transkriptionsfaktoren und aufgrund der großen Homologie zu den Vertretern der EGR-Familie wird WT1 dieser Familie zugeordnet. Die Bindung von WT1 an DNA wird durch die C-terminale Zinkfingerdomäne vermittelt.

Knockout-Experimente belegen, dass WT1 in der frühen Embryonalentwicklung der Niere und der Keimdrüsen essentiell ist (Kreidberg *et al.*, 1993). Das trans-regulatorische Protein EGR1 erkennt die gleiche Konsensus-Bindesequenz (Rauscher *et al.*, 1990) und Beispiele aus der Literatur belegen die Beeinflussung der Genexpression durch beide Transkriptionsfaktoren, WT1 und EGR1. Dazu gehören u.a. IGF2 (*insulin-like growth factor gene*), IGF1-R (*insulin-like growth factor 1 receptor gene*), PDGF (*platelet-derived factor gene*) und CSF1 (*colony stimulating factor gene*) (Bae *et al.*, 1999; Gashler *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1992; Dey *et al.*, 1994).

Viele Promotoren besitzen überlappende Konsensus-Bindesequenzen für die Transkriptionsfaktoren SP1/EGR1 oder SP1/WT1 (Liu *et al.*, 1998). Auch im ph/snGPx-Gen konnten zwei cis-regulatorische Elemente für diese Faktoren nachgewiesen werden. An beiden wurde die Bindung von SP1 nachgewiesen. Das cis-regulatorische Element im Intron 1a bindet EGR1, dagegen wurde im Exon 1b die Bindung von WT1 mit den Kernproteinen der HEK293 Zellen und der murinen Niere nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung der jeweiligen trans-regulatorischen Faktoren SP1/EGR1 oder SP1/WT1 auf einem Verdrängungsmechanismus beruht, der durch die Konzentration der einzelnen Faktoren im Kern und durch die Bindungsaffinität der Sequenz beeinflusst wird (Siverman & Collins, 1999). Da

für beide überlappenden SP1/EGR-Sequenzen im Gelshift Assay die gleichen Kernproteine eingesetzt wurden, ist hier von einer unterschiedlichen Bindungsaffinität der Faktoren EGR1 und WT1 an dem jeweiligen Element auszugehen.

Der Nachweis eines funktionellen cis-regulatorischen Elements im kodierenden Bereich des Exons 1b soll hier noch von einem weiteren Blickwinkel betrachtet werden. Es wurde bereits erläutert, dass SP1 eine grundlegende Funktion in der Transkriptionsregulation besitzt. Die vielfältig nachgewiesenen Interaktionen von SP1 mit anderen regulatorischen Proteinen veranlassten Gunther *et al.* (2000) mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems, nach weiteren potentiellen Partnern für SP1 zu suchen. Dabei wurde der Spleißfaktor SF3A120 identifiziert. Auch für WT1 wird eine mögliche Rolle beim Spleißen von prä-mRNA diskutiert. Ko-Immunopräzipitationsanalysen ebenso wie immunozytochemische Expressionsanalysen konnten zeigen, dass WT1 mit Proteinen des Spleiß-Apparates interagiert bzw. mit ihnen kolokalisiert (Larsson *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1998). Des weiteren konnte im WT1-Protein ein RNA-Erkennungsmotiv nachgewiesen werden (Kennedy *et al.*, 1996).

Das Binden von SP1/WT1 im Exon 1b des ph/snGPx-Gens könnte Einfluss auf die prä-RNA-Prozessierung ausüben, indem die Bindung dieser Faktoren die Erkennung alternativer Spleißorte vermittelt. Dies würde die Annahme unterstützen, die von einer gemeinsamen prä-RNA für phGPx und snGPx ausgeht und alternatives Spleißen das Exon 1a (phGPx) bzw. Exon 1b (snGPx) definiert. Die snGPx wurde bisher nur in den Kernen der späten Spermatiden nachgewiesen. Wir konnten weiterhin die Existenz des Proteins in der murinen Niere nachweisen. WT1 wird gewebespezifisch, überwiegend in der Niere und in den Geschlechtsorganen, exprimiert (Rauscher, 1993) und könnte demnach eine gewebespezifische Expression regulieren.

E-BOX bindende Proteine SREBP1 (*sterol response element-binding protein 1*) und USF1 (*upstream stimulatory factor 1*)

Im Intron 1b des ph/snGPx-Gens wurden die trans-regulatorischen Proteine SREBP1 und USF1 nachgewiesen. Beide Faktoren zählen zu den basischen Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper Proteinen (bHLHZip), die in der Lage sind, an E-Box Motiven zu binden. Des weiteren ist SREBP1 (a und c) neben SREBP2 durch die selektive Bindung an Sterol-responsiblen Elementen (SRE) zahlreicher Gene des Fettstoffwechsels, wie z.B. des LDL-Rezeptors, der Fettsäure-Synthase oder der Acetyl-CoA Carboxylase gekennzeichnet (Edwards *et al.*, 2000; Shimano, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die sterolabhängige Regulation von Promotoren durch die selektive Bindung von SRE-bindenden Proteinen an SREs und nicht an E-Boxen erfolgt (Athaniar & Osborne, 1998).

Die SREBPs sind ungewöhnliche Mitglieder der basischen Helix-Loop-Helix Proteinfamilie von Transkriptionsfaktoren. Sie enthalten in ihrer basischen Domäne anstelle von Arginin, das bei allen bisher bekannten Vertretern dieser Familie konserviert ist, ein Tyrosin (Kim *et al.*, 1995). Diese einzelne Aminosäureveränderung ist für die Fähigkeit der SREBPs verantwortlich sowohl an E-Box- als auch SRE-Motiven zu binden.

Eine weitere außergewöhnliche Eigenschaft der SRE-bindenden Proteine besteht in ihrer intrazellulären Lokalisierung. Die SREBP-Isoformen werden als Vorläufer synthetisiert, die in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle eingebaut sind. Eine Freisetzung des wirksamen Transkriptionsfaktors erfolgt u.a. in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der Zelle. Ein sinkender Cholesterolgehalt führt zur Freisetzung des trans-regulatorischen Proteins einschließlich Kernimport-Sequenz, DNA-Bindedomäne und transkriptioneller Aktivierungsdomäne (Sakai *et al.*, 1996). Im Kern führen die so post-transkriptionell gebildeten SREBPs zur Aktivierung von Genen, die z.B. die Synthese von Cholesterol und/oder Fettsäuren regulieren (Bennett *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 1996).

Transgene Mäuse, die die einzelnen nukleären SREBP-Isoformen überexprimierten, zeigten einen aktivierenden Einfluss auf Gene der Cholesterol- und Fettsäure-Synthese (SREBP1a und 1c). Das SRE-bindende Protein 2 zeigte in diesen Experimenten ausschließlich eine aktivierende Wirkung von Genen der Cholesterol-Biosynthese (Shimano *et al.*, 1997; Horton *et al.*, 1998).

Knockout-Experimente führten bei 70-90% der homozygoten SREBP1 Knockout-Embryos schon nach 10,5-11,5 Tagen zum Tod. Die lebensfähigen Tiere zeigten eine deutlich niedrigere Fettsäure-Synthese als die Kontrolltiere, die mit einem niedrigeren mRNA-Niveau

des Fettsäure-Synthase-Gens einhergeht. SREBP2 Knockout-Mäuse waren nicht lebensfähig (Shimano *et al.*, 1997).

SRE-bindende Proteine sind allein nur schwache Aktivatoren der Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass koregulatorische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. SP1, NF-Y oder CREB für eine optimale Wirkung erforderlich sind (Edwards & Ericsson, 1999; Magana *et al.*, 2000; Dooley *et al.*, 1999). Im Intron 1a des ph/snGPx-Gens konnte die Bindung des trans-regulatorischen Faktors SP1 sowie von Proteinen der CREB-Familie nachgewiesen werden.

Für das SRE-bindende Protein 1 wurde die Bindung im Intron 1a des ph/snGPx-Gens durch Gelshift-Experimente *in vitro* und mittels Chromatin Immunopräzipitation *in vivo* nachgewiesen. Das ph/snGPx-Gen stellt somit ein potentielles Zielgen für das SREBP1 dar. Eine gesteigerte SREBP1-Expression bzw. Freisetzung der nukleären Form führt zur transkriptionellen Aktivierung von Genen des Lipidstoffwechsels. Die ph/snGPx besitzt die Fähigkeit, zelltoxische Hydroperoxide komplexer Esterlipide in die entsprechenden Hydroperoxide zu reduzieren. Während der Zellteilung liegt ein erhöhter Bedarf an Cholesterol und freien Fettsäuren vor, die u.a. für die Bildung von neuen Membranen erforderlich sind. So ist es denkbar, dass u.a. in Phasen des erhöhten Lipidstoffwechsels auch eine gesteigerte zellschützende Wirkung der ph/snGPx erforderlich ist.

Zu den USFs zählen USF1 und USF2, die durch zwei unterschiedliche Gene kodiert werden. Beide Gene werden ubiquitär in Säugerzellen exprimiert, wobei das Verhältnis von USF1 und USF2 sehr unterschiedlich in den verschiedenen Zelltypen ist. (Sirito *et al.*, 1994; Violett *et al.*, 1996). Beide Faktoren binden als Homodimer jedoch deutlich häufiger als Heterodimer an DNA (Sirito *et al.*, 1998).

Der Doppel-Knockout von USF1 und USF2 führt zum frühzeitigen Tod schon während der Embryonalentwicklung (Sirito *et al.*, 1998). Dagegen sind die USF1- oder USF2- Knockout-Mäuse überlebensfähig. Weiterhin konnte eine Rolle von USF1 und USF2 bei der transkriptionellen Aktivierung von Genen durch Glukose belegt werden, wie z.B. der L-Typ Pyruvat-Kinase - einem glykolytischen Enzym oder Spot 14 (S14) - einem Protein, das mit der Lipogenese verbunden ist. Beide Faktoren können sich gegenseitig kompensieren, jedoch mit Auswirkungen auf die Stärke der Genaktivierung (Vallet *et al.*, 1997, Vallet *et al.*, 1998).

Da USFs für zahlreiche Gene als potentielle Regulatoren der Transkription identifiziert wurden, liegt eine Rolle in der basalen Transkription nahe (Henrion *et al.*, 1996). Neben der

aktivierenden Wirkung der USFs kann USF1 auch als Repressor der Transkription fungieren, indem er durch Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren deren Wirkung kompensiert (Takahashi *et al.*, 1997; Lun *et al.*, 1997).

Qyang *et al.* (1999) zeigten, dass die transkriptionelle Aktivität der ubiquitär exprimierten USFs vom Zelltyp abhängig ist. Die Wirksamkeit der trans-regulatorischen USFs hing maßgeblich von mindestens einem zusätzlichen Protein ab, das im Gegensatz zu USF1 und USF2 gewebe- oder zellspezifisch exprimiert wird.

Gene der Lipogenese, wie z.B. Acetyl-CoA Carboxylase- α oder die Fettsäure-Synthase besitzen in ihrer Promotorregion ein Insulin responsables Element (IRE), welches eine Expressionsregulation dieser Gene durch Insulin ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass für eine insulinabhängige Regulation dieser Gene die Bindung von USFs erforderlich ist (Wang & Sul, 1997; Travers *et al.*, 2001).

Die Transkriptionsfaktoren USF1 und SREBP1 sind grundlegend an der Regulation von Genen beteiligt, deren Expression durch Nahrungsbestandteile, wie z.B. Glukose oder Cholesterol beeinflusst werden. Eine Regulation des ph/snGPx-Gens durch die Bindung dieser Faktoren an den entsprechenden cis-regulatorischen Elementen im Intron 1a macht u.a. eine ernährungsabhängige Regulation der ph/snGPx denkbar.

GATA- bindende Proteine der GATA-Familie und cAMP responsables Element (CRE)-bindende Proteine der CREB-Familie

Im Intron 1a des ph/snGPx-Gens konnte weiterhin ein GATA-Bindungsorort für GATA-bindende Proteine identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor GATA1 ist ein Protein mit zwei Zinkfinger-Motiven und stellt eines von sechs bekannten **GATA-bindenden Proteinen** dar. GATA1-3 besitzen eine bedeutende Rolle für die Expression von Genen des blutbildenden Systems. Dagegen regulieren GATA4-6 Gene nicht-blutbildender Gewebe (Cantor & Orkin, 2002).

Knockout-Experimente belegen, dass die Expression von GATA1 essentiell für die Bildung und Entwicklung der Erythrozyten und Thrombozyten ist (Pevny *et al.*, 1991, Simon *et al.*, 1992).

Außerhalb des blutbildenden Systems konnte GATA1 nur in den Sertoli-Zellen des Hodens nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 1993). Während der Spermatogenese ist die GATA1-Expression auf bestimmte Stadien (VII, VIII, IX) begrenzt (Yomogida *et al.*, 1994).

Die Expressionsunterschiede von sertoli-spezifischen Genen während der einzelnen Stadien der Spermatogenese korreliert häufig mit der GATA1-Expression. Durch die selektive Expression von GATA1 während der Spermatogenese wird ebenso ein negativ regulatorischer Einfluss auf die Expression von Genen diskutiert, die in diesen Stadien nicht erforderlich sind.

Die phGPx-mRNA wird im Hoden besonders hoch exprimiert. Das Transkript für die snGPx wurde bisher nur im Hoden und in der Niere nachgewiesen. Auf die Expression des ph/snGPx-Gens im Hoden wirken somit selektive Faktoren. Ob es einen direkten Zusammenhang mit der GATA1-Expression gibt, bleibt zu untersuchen.

Ein weiteres funktionelles cis-regulatorisches Element im Intron 1a des ph/snGPx-Gens ist das **cAMP responsible Element (CRE)**. Es stellt das einzige Element dar, das sowohl in der Sequenz als auch in der Position im Intron 1a zwischen den Spezies konserviert ist.

Zu den CRE-bindenden Proteinen gehören die Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie, die durch alternative Genprodukte von CREB (cAMP responsables Element bindendes Protein), CREM (cAMP responsibler Element Modulator) und ATF-1 (aktivierender Transkriptionsfaktor 1) charakterisiert sind. Aufgrund ihrer Proteinstruktur zählen sie zur Leucin-Zipper-Familie von Transkriptionsfaktoren mit basischer Bindungsdomäne (Shaywitz & Greenberg, 1999).

CREB ist der am meisten untersuchte Transkriptionsfaktor der CREB-Familie. Er ist in vielen Zellen und Geweben zu finden und wird durch physiologische Stimuli, wie z.B. cAMP, Ca^{2+} , Wachstumsfaktoren, Stress oder Cytokine aktiviert (Lonze & Ginty, 2002; Servillo *et al.*, 2002). Für eine Signal-induzierte Transkription durch CREB ist deren Phosphorylierung mit Hilfe der cAMP-abhängigen Protein-Kinase A (PKA) erforderlich. Die Phosphorylierung von CREB ermöglicht weiterhin die Interaktion mit weiteren Proteinen, z.B. mit dem CREB-bindenden Protein (CBP). CBP gilt als Ko-Aktivator, der mit basalen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TFIIB und TBP und der RNA-Polymerase II interagiert (Nakajima *et al.*, 1997). Des Weiteren besitzt CBP Histon-Acetyltransferase-Aktivität. Dies deutet auf eine Beeinflussung der Chromatin-Modifikationen hin (Bannister & Kouzarides, 1996).

CREM stellt durch sein gewebe- und entwicklungsspezifisches Auftreten einen besonders interessanten Transkriptionsfaktor der CREB-Familie dar. Besondere Beachtung verdient die CREM-Expression im Hoden. Während im präpubertären Stadium kaum eine CREM-Expression nachweisbar war, wurde im adulten Hoden eine besonders hohe Expression gezeigt (Foulkes *et al.*, 1992). Durch die Nutzung eines alternativen Promotors des CREM-

Gens entsteht ein Genprodukt, das als induzierbarer cAMP *Early Repressor* (ICER) bezeichnet wird. Das CREM-Gen kodiert demnach sowohl für einen Aktivator (CREM) als auch für einen Repressor (ICER) der Transkription von Genen mit funktionellen CREs. Im präpubertären Hoden ist nur der ICER nachweisbar und somit wird die Expression entsprechender Gene unterdrückt (Foulkes & Sassone-Corsi, 1992).

CREM-defiziente Mäuse zeigen starke Veränderungen des Hodens und keine Spermatozoen. Bei heterozygoten Mäusen ist eine deutliche Reduktion der Spermatozoen zu beobachten, die zum einen in ihrer Beweglichkeit und zum anderen in ihrer Struktur stark beeinträchtigt sind (Nantel *et al.*, 1996). In haploiden Keimzellen ist die DNA sehr kompakt. In CREM-defizienten Mäusen liegt die DNA der haploiden Keimzellen nicht kompakt vor.

Weiterhin kommt CREM eine besondere Rolle bei der Aktivierung von testis-spezifischen Promotoren zahlreicher haploid-exprimierter Gene zu (Sassone-Corsi, 1997).

Die Expression der phGPx und der snGPx besitzen im Hoden eine bedeutende Rolle (Imai & Nakagawa, 2003; Kühn & Borchert, 2002). Eine bei der Ratte durch Selenmangel erzeugte Reduktion der snGPx in den Kernen der späten Spermatiden, führte zu einer gestörten Chromatinkondensation (Behne *et al.*, 2001). Des weiteren stellen die fehlende präpubertäre Expression der ph/snGPx und die selektive Expression der snGPx in den haploiden runden Spermatiden (Puglisi *et al.*, 2003) weitere Parallelen zur CREM-Expression dar. Es ist daher denkbar, dass durch das im Intron 1a des ph/snGPx-Gens identifizierte cAMP responsible Element (CRE) ein entscheidender Einfluss auf die entwicklungs- und gewebespezifische Expression des Gens ausgeübt wird.

4.4. Expression der snGPx in der murinen Niere

Die phGPx und die snGPx gehören zur Familie der funktionell verwandten Glutathion-Peroxidasen. Während die phGPx in vielen Zellen und Geweben exprimiert wird (Brigelius-Flohé, 1999; Knopp *et al.*, 1999), konnte die snGPx bisher nur in den späten Spermatiden verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Pfeifer *et al.*, 2001). In diesen Zellen ist das Enzym in den Kernen lokalisiert und fungiert dort als Protamin Thiol-Peroxidase zur Stabilisierung des kondensierten Chromatins (Pfeifer *et al.*, 2001).

Mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot-Analysen mit einem monoklonalen ph/snGPx-Antikörper konnte die snGPx erstmals in somatischen Zellen (interstitielle Zellen) der murinen Nieren nachgewiesen werden (Borchert *et al.*, 2003). Durch subzelluläre Fraktionierung, immunohistochemische Färbung und Immunelektronen-Mikroskopie konnte eine

Lokalisierung des Enzyms im Zytosol gezeigt werden. Die zytosolische Lokalisierung ist insofern überraschend, da die snGPx ein Kernimport-Peptid enthält, welches den Transport in den Kern erwarten lässt. Gegenwärtig ist nicht geklärt, wie der Transport der snGPx in den Kern erfolgt. Es ist denkbar, dass post-translationelle Modifikationen oder zusätzliche Faktoren, die in den Nierenzellen nicht vorhanden sind, für einen Transport in den Kern benötigt werden.

Die nierenspezifische Funktion der snGPx wurde noch nicht untersucht. Da das Enzym hauptsächlich in interstitiellen Zellen exprimiert wird und nicht in den Glomeruli, im Tubulus oder den Sammelröhren nachgewiesen wurde, scheint kein unmittelbarer Zusammenhang mit der Urinproduktion zu bestehen. Die snGPx in der Niere könnte zum antioxidativen Schutz beitragen, so wie bereits für andere GPx-Isoformen angenommen wurde (Maiorino *et al.*, 1991).

In der Nieren-Rinde herrscht ein sehr aktiver oxidativer Stoffwechsel. Der Sauerstoffverbrauch bezogen auf das Gewicht ist in der Niere höher als in anderen Organen. Die Epithelzellen des proximalen und distalen Tubulus sind extrem reich an Mitochondrien. Da die zelluläre Atmung mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht, ist ein effektiver antioxidativer Schutz notwendig, und die snGPx in den interstitiellen Zellen könnte dazu beitragen.

Im Nieren-Mark ist der Sauerstoffpartialdruck stark reduziert. Unter diesen hypoxischen Bedingungen laufen viele oxidative Reaktionen unkontrolliert ab, wodurch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies erhöht sein könnte (Herget *et al.*, 2000). Damit ist auch im Nieren-Mark ein effektiver antioxidativer Schutz nötig.

4.5. Perspektivische Betrachtungen

Die funktionellen Promotorstudien für die phGPx und snGPx legen die Nutzung eines gemeinsamen Promotors für die Expression beider GPx-Isoformen nahe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der potentiellen Promotorregion für die Bildung der snGPx die Bindung funktioneller trans-regulatorischer Proteine/Proteinfamilien nachgewiesen werden, die einen negativ regulatorischen Einfluss auf die gemeinsame Promotoraktivität des ph/snGPx-Gens ausüben. Ein interessanter Ansatzpunkt für fortführende Untersuchungen wäre die Eingrenzung der dafür verantwortlichen cis-regulatorischen Elemente durch gezielte Mutagenese.

Die Identifizierung eines zwischen den Spezies zu 100% konservierten cAMP respondiblen Elements (CRE) bietet einen weiteren interessanten Ansatzpunkt. Es steht die Frage, wie die gewebespezifische Expressionsregulation der snGPx im Hoden zu erklären ist. Bei einer detaillierten Untersuchung der snGPx-Expression während der Spermatogenese wurde diese sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene ausschließlich nach der Meiose (in haploiden runden Spermatiden) nachgewiesen. Zu den gewebespezifischen CRE-bindenden Proteinen zählt CREM. Das CREM-Gen kodiert sowohl für einen Aktivator (CREM) als auch für einen Repressor (ICER-induzierbarer cAMP früher Repressor) der Transkription. Der Repressor wird im Hoden vor der Meiose exprimiert, der Aktivator dagegen ausschließlich danach. Die Bindung von CREM an CRE trägt zur testis-spezifischen Promotoraktivierung für eine Reihe von haploid exprimierten Genen bei. CRE stellt demnach für die snGPx-Expression ein cis-regulatorisches Element dar, welches die entwicklungsspezifische Expression im Hoden regulieren könnte. *In vivo*-Footprint und die Untersuchung CREM-defizienter Knockout-Mäuse hinsichtlich der snGPx-Expression könnten weitere Belege für deren Relevanz bringen.

Ph/snGPx Knockout-Mäuse belegen eine grundlegende Funktion der ph/snGPx schon während der Embryonalentwicklung. Eine geeignete Methode für die Untersuchung der Genaktivierung stellt der *in vivo*-Promotorassay dar. Basierend auf den *in vitro*-Promotorstudien könnte versucht werden, *in vivo* den Zeitpunkt und den Ort der Promotoraktivierung für die ph/snGPx zu untersuchen.

Der Nachweis eines SP1/WT1-Bindungsortes im Exon 1 für die snGPx und das Fehlen eines separaten Promotors für die snGPx geben den Anlass, alternatives Spleißen als Mechanismus für die Entstehung der ph/snGPx-Isoformen genauer zu untersuchen. Die Untersuchung von RNA/Protein-Kontaktpunkten könnte einen möglichen Einstieg darstellen.

Die snGPx konnte von uns auch in der Niere nachgewiesen werden. Die Regulation und die genaue Funktion bleiben ebenfalls zu untersuchen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson, E. D. and Mercola, D. (2002). "Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival." Tumour Biol **23**(2): 93-102.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. and Fishel, S. (1989). "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." Biol Reprod **41**(1): 183-97.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1995). "Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage.", Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH.
- Alvarez, J. G. and Storey, B. T. (1982). "Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility." Biol Reprod **27**(5): 1102-8.
- Arai, M., Imai, H., Koumura, T., Yoshida, M., Emoto, K., Umeda, M., Chiba, N. and Nakagawa, Y. (1999). "Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells." J Biol Chem **274**(8): 4924-33.
- Ashiya, M. and Grabowski, P. J. (1997). "A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart." Rna **3**(9): 996-1015.
- Athanikar, J. N. and Osborne, T. F. (1998). "Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4935-40.
- Bae, S. K., Bae, M. H., Ahn, M. Y., Son, M. J., Lee, Y. M., Bae, M. K., Lee, O. H., Park, B. C. and Kim, K. W. (1999). "Egr-1 mediates transcriptional activation of IGF-II gene in response to hypoxia." Cancer Res **59**(23): 5989-94.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." Nature **384**(6610): 641-3.
- Behne, D. and Kyriakopoulos, A. (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." Annu Rev Nutr **21**: 453-73.
- Behne, D., Weiler, H. and Kyriakopoulos, A. (1996). "Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats." J Reprod Fertil **106**(2): 291-7.
- Behne, D. and Wolters, W. (1983). "Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat." J Nutr **113**(2): 456-61.
- Belecky-Adams, T., Wight, D. C., Kopchick, J. J. and Parysek, L. M. (1993). "Intragenic sequences are required for cell type-specific and injury-induced expression of the rat peripherin gene." J Neurosci **13**(12): 5056-65.
- Belkner, J., Stender, H. and Kuhn, H. (1998). "The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E." J Biol Chem **273**(36): 23225-32.
- Bennett, M. K., Lopez, J. M., Sanchez, H. B. and Osborne, T. F. (1995). "Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways." J Biol Chem **270**(43): 25578-83.
- Bentley, D. (1999). "Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 347-51.
- Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. and Holmgren, A. (1994). "The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase." J Biol Chem **269**(47): 29382-4.
- Bock, A. (2000). "Biosynthesis of selenoproteins--an overview." Biofactors **11**(1-2): 77-8.

- Borchert, A., Savaskan, N. E. and Kuhn, H. (2003). "Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements." J Biol Chem **278**(4): 2571-80.
- Borchert, A., Schnurr, K., Thiele, B. J. and Kuhn, H. (1999). "Cloning of the mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene." FEBS Lett **446**(2-3): 223-7.
- Borellini, F. and Glazer, R. I. (1993). "Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1." J Biol Chem **268**(11): 7923-8.
- Boschan, C., Borchert, A., Ufer, C., Thiele, B. J. and Kuhn, H. (2002). "Discovery of a functional retrotransposon of the murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: chromosomal localization and tissue-specific expression pattern." Genomics **79**(3): 387-94.
- Bösl, M. R., Takaku, K., Oshima, M., Nishimura, S. and Taketo, M. M. (1997). "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp)." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5531-4.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brielmeier, M., Bechet, J. M., Suppmann, S., Conrad, M., Laux, G. and Bornkamm, G. W. (2001). "Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells." Biofactors **14**(1-4): 179-90.
- Brigelius-Flohe, R. (1999). "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 951-65.
- Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Blocker, H., Gross, G., Kiess, M., Kloppel, K. D., Maiorino, M., Roveri, A., Schuckelt, R., Usani, F. and et al. (1994). "Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence." J Biol Chem **269**(10): 7342-8.
- Brigelius-Flohe, R., Maurer, S., Lotzer, K., Bol, G., Kallionpaa, H., Lehtolainen, P., Viita, H. and Yla-Herttuala, S. (2000). "Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells." Atherosclerosis **152**(2): 307-16.
- Bulger, E. M. and Maier, R. V. (2000). "Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N27-36.
- Burk, R. F. and Hill, K. E. (1993). "Regulation of selenoproteins." Annu Rev Nutr **13**: 65-81.
- Caceres, J. F. and Kornblihtt, A. R. (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." Trends Genet **18**(4): 186-93.
- Cantor, A. B. and Orkin, S. H. (2002). "Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners." Oncogene **21**(21): 3368-76.
- Chakrabarti, R., McCracken, J. B., Jr., Chakrabarti, D. and Souba, W. W. (1995). "Detection of a functional promoter/enhancer in an intron-less human gene encoding a glutamine synthetase-like enzyme." Gene **153**(2): 163-99.
- Chen, C. J., Huang, H. S., Lin, S. B. and Chang, W. C. (2000). "Regulation of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase catalysis by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in A431 cells." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **62**(4): 261-8.
- Chiang, C. M. and Roeder, R. G. (1995). "Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators." Science **267**(5197): 531-6.
- Chu, F. F., Doroshow, J. H. and Esworthy, R. S. (1993). "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI." J Biol Chem **268**(4): 2571-6.

- Chu, F. F. and Esworthy, R. S. (1995). "The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium." Arch Biochem Biophys **323**(2): 288-94.
- Clark, L. C., Combs, G. F., Jr., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Lesher, J. L., Jr., Park, H. K., Sanders, B. B., Jr., Smith, C. L. and Taylor, J. R. (1996). "Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group." Jama **276**(24): 1957-63.
- Conz, P. A., Bevilacqua, P. A., La Greca, G., Danieli, D., Rodighiero, M. P., Cavarretta, L., Maiorino, M., Roveri, A. and Ursini, F. (1993). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the normal human kidney: a possible role in protecting cell membranes." Exp Nephrol **1**(6): 376-8.
- Crawford, D. L., Segal, J. A. and Barnett, J. L. (1999). "Evolutionary analysis of TATA-less proximal promoter function." Mol Biol Evol **16**(2): 194-207.
- Davies, R. C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S. H., Lamond, A. I. and Hastie, N. D. (1998). "WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes." Genes Dev **12**(20): 3217-25.
- de Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., Bronson, R. T., Silvestro, M. J., Wild, S., Zheng, S. S., Beart, P. M., Hertzog, P. J. and Kola, I. (1998). "Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide." J Biol Chem **273**(35): 22528-36.
- Dey, B. R., Sukhatme, V. P., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Rauscher, F. J., 3rd and Kim, S. J. (1994). "Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product." Mol Endocrinol **8**(5): 595-602.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." Nucleic Acids Res **11**(5): 1475-89.
- Dooley, K. A., Bennett, M. K. and Osborne, T. F. (1999). "A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter." J Biol Chem **274**(9): 5285-91.
- Draper, D. E. (1999). "Themes in RNA-protein recognition." J Mol Biol **293**(2): 255-70.
- Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chisoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Smink, L. J., Ainscough, R., Almeida, J. P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K. N., Beasley, O., Bird, C. P., Blakey, S., Bridgeman, A. M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W. D., O'Brien, K. P. and et al. (1999). "The DNA sequence of human chromosome 22." Nature **402**(6761): 489-95.
- Edwards, P. A. and Ericsson, J. (1999). "Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway." Annu Rev Biochem **68**: 157-85.
- Edwards, P. A., Tabor, D., Kast, H. R. and Venkateswaran, A. (2000). "Regulation of gene expression by SREBP and SCAP." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 103-13.
- Emili, A., Greenblatt, J. and Ingles, C. J. (1994). "Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein." Mol Cell Biol **14**(3): 1582-93.
- Englert, C. (1998). "WT1--more than a transcription factor?" Trends Biochem Sci **23**(10): 389-93.
- Epp, O., Ladenstein, R. and Wendel, A. (1983). "The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution." Eur J Biochem **133**(1): 51-69.
- Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T. (2000). "Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes." Nat Genet **24**(4): 363-7.
- Esworthy, R. S., Doan, K., Doroshow, J. H. and Chu, F. F. (1994). "Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." Gene **144**(2): 317-8.

- Feussner, I., Kuhn, H. and Wasternack, C. (2001). "Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids." Trends Plant Sci **6**(6): 268-73.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H. and Kuhn, H. (1995). "Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11849-53.
- Finley, J. W. and Penland, J. G. (1998). "Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings." J Trace Elem Exp Med **11**: 11-27.
- Flohe, L. (1989). "Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Part A. (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds)", pp. 643-731 John Wiley & Sons Inc, New York.
- Flohe, L. (1997). "[Selenium in peroxide metabolism]." Med Klin **92 Suppl 3**: 5-7.
- Flohe, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H. (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." FEBS Lett **32**(1): 132-4.
- Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergesen, T. and Oian, P. (1993). "Mitochondrial disease and reduced sperm motility." Hum Reprod **8**(11): 1863-8.
- Foulkes, N. S., Mellstrom, B., Benusiglio, E. and Sassone-Corsi, P. (1992). "Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator." Nature **355**(6355): 80-4.
- Foulkes, N. S. and Sassone-Corsi, P. (1992). "More is better: activators and repressors from the same gene." Cell **68**(3): 411-4.
- Gashler, A. L., Bonthron, D. T., Madden, S. L., Rauscher, F. J., 3rd, Collins, T. and Sukhatme, V. P. (1992). "Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10984-8.
- Gee, S. L., Aoyagi, K., Lersch, R., Hou, V., Wu, M. and Conboy, J. G. (2000). "Alternative splicing of protein 4.1R exon 16: ordered excision of flanking introns ensures proper splice site choice." Blood **95**(2): 692-9.
- Giannattasio, A., Girotti, M., Williams, K., Hall, L. and Bellastella, A. (1997). "Puberty influences expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) in rat testis: probable hypophysis regulation of the enzyme in male reproductive tract." J Endocrinol Invest **20**(8): 439-44.
- Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (1999). "Selenocysteine-containing proteins in mammals." J Biomed Sci **6**(3): 151-60.
- Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G. and Panfili, E. (1997). "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa." Biol Reprod **57**(6): 1502-8.
- Goldstrohm, A. C., Greenleaf, A. L. and Garcia-Blanco, M. A. (2001). "Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing." Gene **277**(1-2): 31-47.
- Goncalves, I., Duret, L. and Mouchiroud, D. (2000). "Nature and structure of human genes that generate retroseudogenes." Genome Res **10**(5): 672-8.
- Goto, C., Osaka, T. and Mizutani, T. (2001). "A model for Sec incorporation with the regions upstream of the UGA Sec codon to play a key role." Biofactors **14**(1-4): 25-35.
- Gremke, L., Lord, P. C., Sabacan, L., Lin, S. C., Wohlwill, A. and Storti, R. V. (1993). "Coordinate regulation of *Drosophila* tropomyosin gene expression is controlled by multiple muscle-type-specific positive and negative enhancer elements." Dev Biol **159**(2): 513-27.
- Guarnieri, C., Muscari, C. and Caldarera, C. M. (1992). "Mitochondrial production of oxygen free radicals in the heart muscle during the life span of the rat: peak at middle age." Exs **62**: 73-7.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G. (1992). "Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes." Nucleic Acids Res **20**(21): 5519-25.

- Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G. (1994). "Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3." Embo J **13**(16): 3843-51.
- Hallahan, D. E., Dunphy, E., Virudachalam, S., Sukhatme, V. P., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R. (1995). "C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure." J Biol Chem **270**(51): 30303-9.
- Harrison, P. M. and Gerstein, M. (2002). "Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution." J Mol Biol **318**(5): 1155-74.
- Harrison, P. M., Hegyi, H., Balasubramanian, S., Luscombe, N. M., Bertone, P., Echols, N., Johnson, T. and Gerstein, M. (2002). "Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22." Genome Res **12**(2): 272-80.
- Hawkes, W. C. and Hornbostel, L. (1996). "Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit." Biol Psychiatry **39**(2): 121-8.
- Heng, H. H., Squire, J. and Tsui, L. C. (1992). "High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9509-13.
- Heng, H. H. and Tsui, L. C. (1993). "Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization." Chromosoma **102**(5): 325-32.
- Heng, H. H. and Tsui, L. C. (1994). "Free chromatin mapping by FISH." Methods Mol Biol **33**: 109-22.
- Henrion, A. A., Vaulont, S., Raymondjean, M. and Kahn, A. (1996). "Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family." Mamm Genome **7**(11): 803-9.
- Herget, J., Wilhelm, J., Novotna, J., Eckhardt, A., Vytasek, R., Mrazkova, L. and Ostadal, M. (2000). "A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension." Physiol Res **49**(5): 493-501.
- Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M. and Funk, C. D. (1997). "Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia." J Biol Chem **272**(26): 16644-51.
- Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L. and Shimano, H. (1998). "Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2." J Clin Invest **101**(11): 2331-9.
- Huang, F. and Gallo, V. (1997). "Gene structure of the rat kainate receptor subunit KA2 and characterization of an intronic negative regulatory region." J Biol Chem **272**(13): 8618-27.
- Huang, H. S., Chen, C. J. and Chang, W. C. (1999). "The CCAAT-box binding factor NF-Y is required for the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells." FEBS Lett **455**(1-2): 111-6.
- Huang, H. S., Chen, C. J., Lu, H. S. and Chang, W. C. (1998). "Identification of a lipoyxygenase inhibitor in A431 cells as a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." FEBS Lett **424**(1-2): 22-6.
- Huang, H. S., Chen, C. J., Suzuki, H., Yamamoto, S. and Chang, W. C. (1999). "Inhibitory effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase on the activity of lipoyxygenases and cyclooxygenases." Prostaglandins Other Lipid Mediat **58**(2-4): 65-75.
- Huang, R. P., Liu, C., Fan, Y., Mercola, D. and Adamson, E. D. (1995). "Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain." Cancer Res **55**(21): 5054-62.
- Hurst, R., Korytowski, W., Kriska, T., Esworthy, R. S., Chu, F. F. and Girotti, A. W. (2001). "Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses glutathione peroxidase isotype-4." Free Radic Biol Med **31**(9): 1051-65.

- Imai, H. and Nakagawa, Y. (2003). "Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells." Free Radic Biol Med **34**(2): 145-69.
- Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N. and Nakagawa, Y. (1998). "Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." J Biol Chem **273**(4): 1990-7.
- Imai, H., Sumi, D., Hanamoto, A., Arai, M. and Sugiyama, A. (1995). "Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression." J Biochem (Tokyo) **118**(5): 1061-7.
- Imai, H., Sumi, D., Sakamoto, H., Hanamoto, A., Arai, M., Chiba, N. and Nakagawa, Y. (1996). "Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppressed cell death due to oxidative damage in rat basophile leukemia cells (RBL-2H3)." Biochem Biophys Res Commun **222**(2): 432-8.
- Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M. and Nakagawa, Y. (2001). "Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males." Biol Reprod **64**(2): 674-83.
- Ito, E., Toki, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1993). "Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis." Nature **362**(6419): 466-8.
- Jallat, S., Perraud, F., Dalemans, W., Balland, A., Dieterle, A., Faure, T., Meulien, P. and Pavirani, A. (1990). "Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines." Embo J **9**(10): 3295-301.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R. (1987). "Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain." Cell **51**(6): 1079-90.
- Kallunki, P., Jenkinson, S., Edelman, G. M. and Jones, F. S. (1995). "Silencer elements modulate the expression of the gene for the neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM." J Biol Chem **270**(36): 21291-8.
- Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996). "Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F." Mol Cell Biol **16**(4): 1659-67.
- Kelner, M. J. and Montoya, M. A. (1998). "Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3." Biochem Biophys Res Commun **249**(1): 53-5.
- Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J. and Little, M. (1996). "An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling." Nat Genet **12**(3): 329-31.
- Khachigian, L. M., Lindner, V., Williams, A. J. and Collins, T. (1996). "Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury." Science **271**(5254): 1427-31.
- Kim, J. B., Spotts, G. D., Halvorsen, Y. D., Shih, H. M., Ellenberger, T., Towle, H. C. and Spiegelman, B. M. (1995). "Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain." Mol Cell Biol **15**(5): 2582-8.
- Kim, J. G. and Parthasarathy, S. (1998). "Oxidation and the spermatozoa." Semin Reprod Endocrinol **16**(4): 235-9.
- Kingsley, C. and Winoto, A. (1992). "Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression." Mol Cell Biol **12**(10): 4251-61.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Wishe, H. I., Cohen, M. W. and Stotzky, G. (1994). "Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells." Biol Trace Elem Res **41**(1-2): 115-27.

- Knopp, E. A., Arndt, T. L., Eng, K. L., Caldwell, M., LeBoeuf, R. C., Deeb, S. S. and O'Brien, K. D. (1999). "Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping." Mamm Genome **10**(6): 601-5.
- Köhrle, J., Brigelius-Flohe, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O. and Flohe, L. (2000). "Selenium in biology: facts and medical perspectives." Biol Chem **381**(9-10): 849-64.
- Kosaka, T., Nagatsu, I., Wu, J. Y. and Hama, K. (1986). "Use of high concentrations of glutaraldehyde for immunocytochemistry of transmitter-synthesizing enzymes in the central nervous system." Neuroscience **18**(4): 975-90.
- Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. and Jaenisch, R. (1993). "WT-1 is required for early kidney development." Cell **74**(4): 679-91.
- Kühn, H. and Borchert, A. (2002). "Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes." Free Radic Biol Med **33**(2): 154-72.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P. and Flavell, R. A. (1998). "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9." Cell **94**(3): 325-37.
- Ladenstein, R., Epp, O., Bartels, K., Jones, A., Huber, R. and Wendel, A. (1979). "Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution." J Mol Biol **134**(2): 199-218.
- Larsson, S. H., Charlier, J. P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V. and Hastie, N. D. (1995). "Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing." Cell **81**(3): 391-401.
- Lewin, B. (2000). "Genes VII / Benjamin Lewin. 7th ed., Oxford, Oxford University Press."
- Lewis, R. A., Austen, K. F. and Soberman, R. J. (1990). "Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases." N Engl J Med **323**(10): 645-55.
- Liberati, C., Ronchi, A., Lievens, P., Ottolenghi, S. and Mantovani, R. (1998). "NF-Y organizes the gamma-globin CCAAT boxes region." J Biol Chem **273**(27): 16880-9.
- Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E. and Mercola, D. (1998). "Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1." Cancer Gene Ther **5**(1): 3-28.
- Liu, H. X., Zhang, M. and Krainer, A. R. (1998). "Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins." Genes Dev **12**(13): 1998-2012.
- Liu, Q. R. and Chan, P. K. (1990). "Identification of a long stretch of homopurine.homopyrimidine sequence in a cluster of retroposons in the human genome." J Mol Biol **212**(3): 453-9.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2001). "Molekulare Zellbiologie, 4. Auflage." Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Loir, M. and Lanneau, M. (1978). "Transformation of ram spermatid chromatin." Exp Cell Res **115**(2): 231-43.
- Lonze, B. E. and Ginty, D. D. (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." Neuron **35**(4): 605-23.
- Look, M. P., Rockstroh, J. K., Rao, G. S., Kreuzer, K. A., Spengler, U. and Sauerbruch, T. (1997). "Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection." Biol Trace Elem Res **56**(1): 31-41.
- Lopez, J. M., Bennett, M. K., Sanchez, H. B., Rosenfeld, J. M. and Osborne, T. E. (1996). "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1049-53.

- Low, S. C. and Berry, M. J. (1996). "Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes." Trends Biochem Sci **21**(6): 203-8.
- Lun, Y., Sawadogo, M. and Perry, M. (1997). "Autoactivation of *Xenopus* MyoD transcription and its inhibition by USF." Cell Growth Differ **8**(3): 275-82.
- Magana, M. M., Koo, S. H., Towle, H. C. and Osborne, T. F. (2000). "Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase." J Biol Chem **275**(7): 4726-33.
- Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F. and Flohe, L. (1995). "Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(11): 651-60.
- Maiorino, M., Chu, F. F., Ursini, F., Davies, K. J., Doroshov, J. H. and Esworthy, R. S. (1991). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines." J Biol Chem **266**(12): 7728-32.
- Maiorino, M., Thomas, J. P., Girotti, A. W. and Ursini, F. (1991). "Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides." Free Radic Res Commun **12-13 Pt 1**: 131-5.
- Mantovani, R., Pessara, U., Tronche, F., Li, X. Y., Knapp, A. M., Pasquali, J. L., Benoist, C. and Mathis, D. (1992). "Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription." Embo J **11**(9): 3315-22.
- Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1992). "A new method for sequencing DNA. 1977." Biotechnology **24**: 99-103.
- McCloy, R. (1998). "Chronic pancreatitis at Manchester, UK. Focus on antioxidant therapy." Digestion **59 Suppl 4**: 36-48.
- Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P. and Davidson, I. (1997). "Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells." Genes Dev **11**(11): 1381-95.
- Merika, M. and Orkin, S. H. (1995). "Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF." Mol Cell Biol **15**(5): 2437-47.
- Mighell, A. J., Smith, N. R., Robinson, P. A. and Markham, A. F. (2000). "Vertebrate pseudogenes." FEBS Lett **468**(2-3): 109-14.
- Modafferi, E. F. and Black, D. L. (1997). "A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon." Mol Cell Biol **17**(11): 6537-45.
- Murray, J. J. and Brash, A. R. (1988). "Rabbit reticulocyte lipoxygenase catalyzes specific 12(S) and 15(S) oxygenation of arachidonoyl-phosphatidylcholine." Arch Biochem Biophys **265**(2): 514-23.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D. and Montminy, M. (1997). "RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II." Cell **90**(6): 1107-12.
- Nam, S., Nakamuta, N., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. (1997). "Cloning and sequencing of the mouse cDNA encoding a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase." Gene **198**(1-2): 245-9.
- Nam, S. Y., Fujisawa, M., Kim, J. S., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. (1998). "Expression pattern of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis." Biol Reprod **58**(5): 1272-6.
- Nantel, F. and Sassone-Corsi, P. (1996). "CREM: A transcriptional master switch during the spermatogenesis differentiation program." Front Biosci **1**: d266-9.

- Néve, J. (1996). "Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases." J Cardiovasc Risk **3**: 42-47.
- Nissim-Rafinia, M. and Kerem, B. (2002). "Splicing regulation as a potential genetic modifier." Trends Genet **18**(3): 123-7.
- Noe, V., Alemany, C., Chasin, L. A. and Ciudad, C. J. (1998). "Retinoblastoma protein associates with SP1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter." Oncogene **16**(15): 1931-8.
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Arai, M. and Nakagawa, Y. (1999). "Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway." J Biol Chem **274**(41): 29294-302..
- Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T. and Nakagawa, Y. (2000). "Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis." Biochem J **351**: 183-93.
- Oldereid, N. B., Thomassen, Y. and Purvis, K. (1998). "Selenium in human male reproductive organs." Hum Reprod **13**(8): 2172-6.
- Oskouian, B., Rangan, V. S. and Smith, S. (1997). "Regulatory elements in the first intron of the rat fatty acid synthase gene." Biochem J **324** (Pt 1): 113-21.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H. and Costantini, F. (1991). "Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1." Nature **349**(6306): 257-60.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W. and Behne, D. (2001). "Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation." Faseb J **15**(7): 1236-8.
- Pretsch, W., Chatterjee, B., Favor, J., Merkle, S. and Sandulache, R. (1998). "Molecular, genetic and biochemical characterization of lactate dehydrogenase-A enzyme activity mutations in *Mus musculus*." Mamm Genome **9**(2): 144-9.
- Ptashne, M. (1986). "Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance." Nature **322**(6081): 697-701.
- Puglisi, R., Tramer, F., Panfili, E., Micali, F., Sandri, G. and Boitani, C. (2003). "Differential splicing of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in diploid and haploid male germ cells in the rat." Biol Reprod **68**(2): 405-11.
- Pushpa-Rekha, T. R., Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M. and Driscoll, D. M. (1995). "Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites." J Biol Chem **270**(45): 26993-9.
- Qyang, Y., Luo, X., Lu, T., Ismail, P. M., Krylov, D., Vinson, C. and Sawadogo, M. (1999). "Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation." Mol Cell Biol **19**(2): 1508-17.
- Rao, B., Soufir, J. C., Martin, M. and David, G. (1989). "Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility." Gamete Res **24**(2): 127-34.
- Rauscher, F. J., 3rd (1993). "The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor." Faseb J **7**(10): 896-903.
- Rauscher, F. J., 3rd, Morris, J. F., Tournay, O. E., Cook, D. M. and Curran, T. (1990). "Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence." Science **250**(4985): 1259-62.
- Reed, J. C. (1997). "Cytochrome c: can't live with it--can't live without it." Cell **91**(5): 559-62.
- Roberts, G. C. and Smith, C. W. (2002). "Alternative splicing: combinatorial output from the genome." Curr Opin Chem Biol **6**(3): 375-83.

- Rogers, J. H. (1985). "The origin and evolution of retroposons." *Int Rev Cytol* **93**: 187-279.
- Roveri, A., Casasco, A., Maiorino, M., Dalan, P., Calligaro, A. and Ursini, F. (1992). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification." *J Biol Chem* **267**(9): 6142-6.
- Roveri, A., Maiorino, M. and Ursini, F. (1994). "Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase." *Methods Enzymol* **233**: 202-12.
- Ryu, S., Zhou, S., Ladurner, A. G. and Tjian, R. (1999). "The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1." *Nature* **397**(6718): 446-50.
- Sadhu, A., Shen, M. L., Hackbarth, M., Hume, E. and McKeithan, T. W. (1997). "CpG-rich sequences close to the site of duplication within the human IGH constant region." *Immunogenetics* **45**(6): 365-70.
- Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1996). "Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment." *Cell* **85**(7): 1037-46.
- Sakamoto, H., Imai, H. and Nakagawa, Y. (2000). "Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis." *J Biol Chem* **275**(51): 40028-35.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Samuelsson, B., Dahlen, S. E., Lindgren, J. A., Rouzer, C. A. and Serhan, C. N. (1987). "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects." *Science* **237**(4819): 1171-6.
- Sarkar, S. and Cowan, N. J. (1991). "Regulation of expression of glial filament acidic protein." *J Cell Sci Suppl* **15**: 97-102.
- Sassone-Corsi, P. (1997). "Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells." *Cell* **88**(2): 163-6.
- Sattler, W., Maiorino, M. and Stocker, R. (1994). "Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51)." *Arch Biochem Biophys* **309**(2): 214-21.
- Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C. and Rapoport, S. M. (1975). "A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria." *FEBS Lett* **60**(1): 149-52.
- Schewe, T., Rapoport, S. M. and Kuhn, H. (1986). "Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**: 191-272.
- Schnurr, K., Belkner, J., Ursini, F., Schewe, T. and Kuhn, H. (1996). "The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products." *J Biol Chem* **271**(9): 4653-8.
- Schnurr, K., Borchert, A., Gerth, C., Anton, M. and Kuhn, H. (2000). "Bacterial and nonbacterial expression of wild-type and mutant human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and purification of the mutant enzyme in the milligram scale." *Protein Expr Purif* **19**(3): 403-10.
- Schnurr, K., Borchert, A. and Kuhn, H. (1999). "Inverse regulation of lipid-peroxidizing and hydroperoxyl lipid-reducing enzymes by interleukins 4 and 13." *Faseb J* **13**(1): 143-54.
- Servillo, G., Della Fazia, M. A. and Sassone-Corsi, P. (2002). "Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM." *Exp Cell Res* **275**(2): 143-54.
- Shaheen, S. O., Sterne, J. A., Thompson, R. L., Songhurst, C. E., Margetts, B. M. and Burney, P. G. (2001). "Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(10 Pt 1): 1823-8.

- Shaywitz, A. J. and Greenberg, M. E. (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." Annu Rev Biochem **68**: 821-61.
- Shimano, H. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes." Prog Lipid Res **40**(6): 439-52.
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S. and Horton, J. D. (1997). "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." J Clin Invest **100**(8): 2115-24.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." Oncogene **13**(1): 21-9.
- Silver, L. M. (1995). "Mouse Genetics, Concepts and Applications." Oxford, Oxford University Press.
- Silverman, E. S. and Collins, T. (1999). "Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology." Am J Pathol **154**(3): 665-70.
- Simon, M. C., Pevny, L., Wiles, M. V., Keller, G., Costantini, F. and Orkin, S. H. (1992). "Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells." Nat Genet **1**(2): 92-8.
- Singh, R. (2002). "RNA-protein interactions that regulate pre-mRNA splicing." Gene Expr **10**(1-2): 79-92.
- Sirito, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R. and Sawadogo, M. (1998). "Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3758-63.
- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T. and Sawadogo, M. (1994). "Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells." Nucleic Acids Res **22**(3): 427-33.
- Smith, C. W. and Valcarcel, J. (2000). "Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control." Trends Biochem Sci **25**(8): 381-8.
- Sorge, J., Gross, E., West, C. and Beutler, E. (1990). "High level transcription of the glucocerebrosidase pseudogene in normal subjects and patients with Gaucher disease." J Clin Invest **86**(4): 1137-41.
- Spallholz, J. E. (1990). "Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system." Adv Exp Med Biol **262**: 145-58.
- Spencer, C. A. and Groudine, M. (1990). "Transcription elongation and eukaryotic gene regulation." Oncogene **5**(6): 777-85.
- Straus, D. S. and Glass, C. K. (2001). "Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets." Med Res Rev **21**(3): 185-210.
- Straus, W. (1982). "Imidazole increases the sensitivity of the cytochemical reaction for peroxidase with diaminobenzidine at a neutral pH." J Histochem Cytochem **30**(5): 491-3.
- Sunde, R. A., Dyer, J. A., Moran, T. V., Evenson, J. K. and Sugimoto, M. (1993). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: full-length pig blastocyst cDNA sequence and regulation by selenium status." Biochem Biophys Res Commun **193**(3): 905-11.
- Sunde, R. A., Thompson, B. M., Palm, M. D., Weiss, S. L., Thompson, K. M. and Evenson, J. K. (1997). "Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells." Biomed Environ Sci **10**(2-3): 346-55.
- Suske, G. (1999). "The Sp-family of transcription factors." Gene **238**(2): 291-300.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. and Cohen, H. (1987). "Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme." Arch Biochem Biophys **256**(2): 677-86.

- Takahashi, T., Guron, C., Shetty, S., Matsui, H. and Raghow, R. (1997). "A minimal murine Msx-1 gene promoter. Organization of its cis-regulatory motifs and their role in transcriptional activation in cells in culture and in transgenic mice." J Biol Chem **272**(36): 22667-78.
- Taylor, E. W., Nadimpalli, R. G. and Ramanathan, C. S. (1997). "Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins." Biol Trace Elem Res **56**(1): 63-91.
- Telliez, J. B., Plumb, M., Balmain, A. and Bailleul, B. (1995). "Regulatory elements in the first intron of the mouse Ha-ras gene." Mol Carcinog **12**(3): 137-45.
- Thiel, G. and Cibelli, G. (2002). "Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1." J Cell Physiol **193**(3): 287-92.
- Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A. W. (1990). "Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins." Biochim Biophys Acta **1045**(3): 252-60.
- Travers, M. T., Vallance, A. J., Gourlay, H. T., Gill, C. A., Klein, I., Bottema, C. B. and Barber, M. C. (2001). "Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes." Biochem J **359**(Pt 2): 273-84.
- Trojanowski, J. Q., Obrocka, M. A. and Lee, V. M. (1983). "A comparison of eight different chromogen protocols for the demonstration of immunoreactive neurofilaments or glial filaments in rat cerebellum using the peroxidase-antiperoxidase method and monoclonal antibodies." J Histochem Cytochem **31**(10): 1217-23.
- Tsukahara, T., Casciato, C. and Helfman, D. M. (1994). "Alternative splicing of beta-tropomyosin pre-mRNA: multiple cis-elements can contribute to the use of the 5'- and 3'-splice sites of the nonmuscle/smooth muscle exon 6." Nucleic Acids Res **22**(12): 2318-25.
- Ursini, F. and Bindoli, A. (1987). "The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes." Chem Phys Lipids **44**(2-4): 255-76.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohe, L. (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." Science **285**(5432): 1393-6.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. and Gregolin, C. (1982). "Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides." Biochim Biophys Acta **710**(2): 197-211.
- Vallet, V. S., Casado, M., Henrion, A. A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A. and Vaulont, S. (1998). "Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose." J Biol Chem **273**(32): 20175-9.
- Vallet, V. S., Henrion, A. A., Bucchini, D., Casado, M., Raymondjean, M., Kahn, A. and Vaulont, S. (1997). "Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 ^{-/-} mice." J Biol Chem **272**(35): 21944-9.
- van Leyen, K., Duvoisin, R. M., Engelhardt, H. and Wiedmann, M. (1998). "A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation." Nature **395**(6700): 392-5.
- Vanin, E. F. (1985). "Processed pseudogenes: characteristics and evolution." Annu Rev Genet **19**: 253-72.
- Venter, J. *et al.* (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Viollet, B., Lefrancois-Martinez, A. M., Henrion, A., Kahn, A., Raymondjean, M. and Martinez, A. (1996). "Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms." J Biol Chem **271**(3): 1405-15.
- Wagner, M. (1986). "A consideration of the origin of processed pseudogenes." Trends Genet **5**: 134-137.

- Wang, D. and Sul, H. S. (1997). "Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter." J Biol Chem **272**(42): 26367-74.
- Wang, H. P., Qian, S. Y., Schafer, F. Q., Domann, F. E., Oberley, L. W. and Buettner, G. R. (2001). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy." Free Radic Biol Med **30**(8): 825-35.
- Wang, Z. Y. and Deuel, T. F. (1992). "An S1 nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the PDGF A-chain promoter contains a novel binding site for the growth factor-inducible protein EGR-1." Biochem Biophys Res Commun **188**(1): 433-9.
- Weiner, A. M. (2000). "Do all SINEs lead to LINEs?" Nat Genet **24**(4): 332-3.
- Werz, O. and Steinhilber, D. (1996). "Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells." Eur J Biochem **242**(1): 90-7.
- Wessel, D. and Flugge, U. I. (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**(1): 141-3.
- Woolveridge, I., de Boer-Brouwer, M., Taylor, M. F., Teerds, K. J., Wu, F. C. and Morris, I. D. (1999). "Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes." Biol Reprod **60**(2): 461-70.
- Yagi, K., Komura, S., Kojima, H., Sun, Q., Nagata, N., Ohishi, N. and Nishikimi, M. (1996). "Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxide-mediated injury." Biochem Biophys Res Commun **219**(2): 486-91.
- Yant, L. J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, J. G., Motta, L., Richardson, A. and Prolla, T. A. (2003). "The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults." Free Radic Biol Med **34**(4): 496-502.
- Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1994). "Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells." Development **120**(7): 1759-66.
- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. and Mak, T. W. (1998). "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." Cell **94**(6): 739-50.
- Yoshimura, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozawa, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Hatta, H. and Moriuchi, T. (1991). "Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney." J Biochem (Tokyo) **109**(6): 918-23.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." Physiol Rev **74**(1): 139-62.
- Yu, S. Y., Zhu, Y. J. and Li, W. G. (1997). "Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong." Biol Trace Elem Res **56**(1): 117-24.
- Zabel, M. D., Byrne, B. L., Weis, J. J. and Weis, J. H. (2000). "Cell-specific expression of the murine CD21 gene depends on accessibility of promoter and intronic elements." J Immunol **165**(8): 4437-45.
- Zachara, B. A. (1992). "Mammalian selenoproteins." J Trace Elem Electrolytes Health Dis **6**(3): 137-51.
- Zhai, G., Iskandar, M., Barilla, K. and Romaniuk, P. J. (2001). "Characterization of RNA aptamer binding by the Wilms' tumor suppressor protein WT1." Biochemistry **40**(7): 2032-40.

Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Berlin, 30.04.2003

Astrid Borchert

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Astrid Borchert
Geburtsdatum:	07.01.1969
Geburtsort:	Crivitz
1975-1985	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Crivitz
1985-1987	Erweiterte Oberschule in Crivitz
1987	Abitur
1987 - 1992	Studium an der Humboldt-Universität zu Berlin in der Fachrichtung Lebensmittelchemie mit Diplom
16.09.1990	Geburt meiner Tochter Anika
1991	Hauptprüfung, Teil A, für Lebensmittelchemiker
1992	Diplom zum Thema: „Isolierung, Reinigung und Charakterisierung der Rapslipase aus Brassica napus, cv.ceres“
1992 - 1993	Praktikum zur Hauptprüfung, Teil B, für Lebensmittelchemiker am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin und am Landesuntersuchungsinstitut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin
1993	Hauptprüfung, Teil B, für Lebensmittelchemiker
1993 - 1995	Tätigkeit als Verfahreningenieur an einem von der Beratungs- und Service-Gesellschaft mbH geförderten Projekt zur Gewinnung und Auswertung umweltrelevanter Daten
seit 1995	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
27.07.1996	Geburt meines Sohnes Hannes
1996 - 1997	Erziehungsurlaub

Berlin, 30.04.2003

Astrid Borchert

Publikationen

- Borchert, A.**, Schnurr, K., Thiele, B. J. and Kühn, H. (1999). "Cloning of the mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene." FEBS Lett **446**(2-3): 223-7.
- Schnurr, K., **Borchert, A.** and Kühn, H. (1999). "Inverse regulation of lipid-peroxidizing and hydroperoxyl lipid-reducing enzymes by interleukins 4 and 13." Faseb J **13**(1): 143-54.
- Schnurr, K., **Borchert, A.**, Gerth, C., Anton, M. and Kühn, H. (2000). "Bacterial and nonbacterial expression of wild-type and mutant human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and purification of the mutant enzyme in the milligram scale." Protein Expr Purif **19**(3): 403-10.
- Boschan, C., **Borchert, A.**, Ufer, C., Thiele, B. J. and Kühn, H. (2002). "Discovery of a functional retrotransposon of the murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: chromosomal localization and tissue-specific expression pattern." Genomics **79**(3): 387-94.
- Kühn, H. and **Borchert, A.** (2002). "Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes." Free Radic Biol Med **33**(2): 154-72.
- Borchert, A.**, Savaskan, N. E. and Kühn, H. (2003). "Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements." J Biol Chem **278**(4): 2571-80.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die interessante Themenstellung zu bearbeiten. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und durch zahlreiche Diskussionen erhielt ich viele Anregungen und wertvolle Ratschläge, die entscheidend mein Interesse an der Forschungstätigkeit geprägt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Stahl danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung meiner Promotionsarbeit an der Fakultät III-Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zu übernehmen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Dr. Kerstin Schnurr, die mir den Einstieg in diese Thematik ermöglichte und die präzise Ausführung von zahlreichen molekularbiologischen Methoden beibrachte. Sie war für mich stets ein Vorbild an Zuverlässigkeit, Kooperationsfähigkeit und menschlichem Verhalten.

Herrn Dr. N. Savaskan, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Charité, danke ich für die zuverlässige Zusammenarbeit bei der Durchführung der immunohistochemischen und immun-elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Bei Christoph Ufer bedanke ich mich für die vielen konstruktiven Diskussionen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Bürger, die immer schnell und zuverlässig die Sequenzierung der Plasmidkonstrukte durchgeführt hat.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau Christa Gerth für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, insbesondere für die FPLC-Reinigungen danken.

Frau Monika Anton danke ich für die vielen anregenden Diskussionen, für die gemeinsame Arbeit im Labor und ihre ständige freundschaftliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die zu dem angenehmen und kollegialen Arbeitsklima beigetragen haben, sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Meinen Eltern, meinen Kindern und meinem Mann gilt ein ganz besonderer Dank. Ohne ihre Unterstützung und ihr Verständnis hätte ich diese Arbeit nicht geschafft.